

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2001-513986

(P2001-513986A)

(43)公表日 平成13年9月11日(2001.9.11)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト [*] (参考)
C 12 N 15/09	Z NA	A 61 K 9/107	4 B 0 2 4
A 61 K 9/107		39/12	4 B 0 6 4
39/12		39/145	4 B 0 6 5
39/145		39/39	4 C 0 7 6
39/39		A 61 P 35/00	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全131頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願2000-507701(P2000-507701)
(86) (22)出願日	平成10年8月17日(1998.8.17)
(85)翻訳文提出日	平成12年2月22日(2000.2.22)
(86)国際出願番号	PCT/EP98/05285
(87)国際公開番号	WO99/10375
(87)国際公開日	平成11年3月4日(1999.3.4)
(31)優先権主張番号	9717953.5
(32)優先日	平成9年8月22日(1997.8.22)
(33)優先権主張国	イギリス(GB)

(71)出願人	スマスクライン ピーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム ベルギー国 リキセンザール ピー 1330 ルー デ ランスティチュート 89
(72)発明者	ブリュック, クローディース ベルギー国, ベ-1330 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティチュ 89, スミス クライン ピーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
(74)代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】ワクチン

(57)【要約】

本発明は、HPV抗原に対するTヘルバーエピトープを供する免疫学的融合パートナーに連結した。ヒトパピローマウイルス(HPV)融合タンパク質を供する。HPV誘導性障害の治療又は予防に役立つワクチン製剤を供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫学的融合パートナーに連結したHPVからのE6もしくはE7タンパク質又はE6/E7融合タンパク質。

【請求項2】 前記融合パートナーが、次の群：ヘモフィルスインフルエンゼBからのプロテインD又はそのフラグメント、ヘモフィルスインフルエンゼBからのリポプロテインD又はそのフラグメント、インフルエンザウイルスからのN S 1又はそのフラグメント、及び肺炎連鎖菌からのLYT A又はそのフラグメントから選択されることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 前記E6又はE7タンパク質が、HPV16又はHPV18から得られることを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項4】 前記E7タンパク質が突然変異されていることを特徴とする請求項1、2又は3に記載のタンパク質。

【請求項5】 前記E6タンパク質が突然変異されていることを特徴とする請求項1、2又は3に記載のタンパク質。

【請求項6】 少くとも4ヒステジン残基のヒステジンタグを更に含む請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項7】 異種タンパク質、ヒステジンタグ及びC-L Y T Aタグを含む融合タンパク質。

【請求項8】 先の請求項のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA配列。

【請求項9】 請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質と、医薬として許容される希釈剤又は賦形剤と、を含むワクチン。

【請求項10】 アジュバントを更に含む請求項9に記載のワクチン。

【請求項11】 前記タンパク質が水性エマルションビヒクリル中の油内に供されることを特徴とする請求項9又は10に記載のワクチン。

【請求項12】 前記アジュバントが、3D-MPLもしくはQS21又はそれら両方を含むことを特徴とする請求項10又は11に記載のワクチン。

【請求項13】 更なるHPV抗原を含む請求項9～12のいずれかに記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ヒトバビローマ誘導性腫瘍の治療又は予防において利用性が見い出される、Tヘルパーエビトープを供するタンパク質又はタンパク質の一部分、及びヒトバビローマウイルスからの抗原を含む融合タンパク質に関する。特に、本発明は、ヘモフィルスインフルエンゼBからのプロテインDに連結したHPV株16又は18からのE6又はE7を含む融合タンパク質に関する。

【0002】

バビローマウイルスは、極めて種特異的である小さな裸のDNA腫瘍ウイルス(7、9キロベース；二本鎖)である。70を超える個々のヒトバビローマウイルス(HPV)遺伝子型が記述されている。バビローマウイルスは起源の種(ヒト、ウシ等)及び同じ種からの他のバビローマウイルスとの遺伝子の関連性の程度に基づいて分類されている。HPVは皮膚又は粘膜表面に一般に特異的であり、異常又は腫瘍組織における各々まれな及び一般的な接出に基づいて“低い”及び“高い”危険性に広く分類されている。低い危険性のHPVは通常、数ヶ月又は数年間、持続する良性障害(疣瘡又は乳頭瘤)を引きおこす。HPVとヒトとの間の最も強い陽性の関連性は、HPV16及び18並びに子宮頸癌の間に存在するものである。より少い頻度であるが、10を超える他のHPV型も子宮頸癌において見い出されている。

【0003】

若い性的に活動している女性における生殖器HPV感染は一般的であり、ほとんどの個体が感染を取り除いているか、又は障害が進行しているなら、これらは回復する。感染した個体のサブセットのみが高グレード上皮内新形成に進行し、これらの進行のほんの少しだけが更に浸潤癌になる障害を有する。

HPV感染を導く分子の出来事は明確に確立されていない。ヒトバビローマウイルスを繁殖させる適当な試験管内システムの欠損がウイルスサイクルについての最も優れた情報への進行を告している。

【0004】

今日、異なる型のHPVが単離されており、細菌でのクローニングシステムに

【請求項14】 医薬に用いるための請求項9～13のいずれかに記載のワクチン。

【請求項15】 HPVにより誘導される良性又は悪性の腫瘍を思う被検体を免疫療法により治療するためのワクチンの製造のための請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項16】 HPVウイルス感染を予防するためのワクチンの製造のための請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項17】 請求項8に記載のDNA配列を含むベクター。

【請求項18】 請求項8に記載のDNA配列と、オレドキシンをコードするDNA配列と、を含むベクター。

【請求項19】 請求項8に記載のDNA配列で形質転換された宿主。

【請求項20】 請求項17又は18に記載のベクターで形質転換された宿主。

【請求項21】 オレドキシンをコードするDNA配列で更に形質転換された請求項19に記載の宿主。

【請求項22】 請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質を生産するための方法であって、宿主細胞を請求項6に記載のDNA配列で形質転換し、該配列を発現させ、そして要求される産物を単離することを含む方法。

【請求項23】 請求項9～14のいずれかに記載のワクチンを生産するための方法であって、請求項1～7のいずれかに記載のタンパク質を、適切なアジュバント、希釈剤又は他の医薬として許容される賦形剤と混合することを含む方法。

より、及びより最近はPCR増幅によりキャラクタライズされている。HPVゲノムの分子構造は十分にキャラクタライズされたウシバビローマウイルス1型(HPV1)のものとの比較に基づいて定義されている。

小さな変異があるが、記述されている全てのHPVは少くとも7の早期遺伝子E1～E7及び2つの後期遺伝子L1及びL2を有する。更に、上流調節領域は、HPVゲノムのほとんどの転写による出来事を制御するようである調節配列を有する。

【0005】

E1及びE2遺伝子は、各々ウイルス複製及び転写制御に関連し、ウイルス組込みにより破壊される傾向がある。E6及びE7はウイルス形質転換に関連する。E5もこの過程に関係している。

HPV16及び18のような子宮頸癌に関連するHPVにおいてオンコジーンの過程はウイルスDNAの組込み後に開始する。その組込みはキャプシドタンパク質L1及びL2をコードする遺伝子を不活性化させ、E2レプレッサー機能の喪失は2つの早期タンパク質E6及びE7の連続的な過剰発現を配置するE6/E7オープン読み枠の統制排除を導き、それは正常な細胞の分化を次第に失わせ、癌を進展させるであろう。E6及びE7は、各々、網膜芽腫遺伝子産物である主要腫瘍サブレッサータンパク質p53及びpRBを不活性化することにより正常な細胞周期を克服する。

【0006】

子宮頸の癌は女性において一般的であり、前癌中間段階を経て浸潤癌に進展し、頻繁に死を導く。その病気の中間段階は子宮頸上皮内新形成として知られており、激しさの増加と共にI～III段階である(CINI～III)。

臨床的に、女性の肛門性器官のHPV感染は子宮頸扁平コンジロームとして顯在化し、その特徴は子宮頸扁平上皮の表面及び中間細胞に主に作用する空胞細胞症である。

【0007】

ウイルスの細胞病理効果の結果であるコイロサイト(koilocytes)は核周囲の透明な光輪を伴う多核化細胞として現れる。その上皮はその障害のいぼ状の外観

の原因である異常な角質化を伴って厚くなる。

このような扁平コンジロームは、HPV16又は18血清型について陽性である場合、浸潤癌の前駆障害とそれ自体考えられる子宮頸上皮内新形成（CIN）及び上皮内癌（カルチノーマーインーサイチュウ）に対する進行に対する高い危険性の因子である。

【0008】

発癌性HPV感染の自然の経過は、3つの連続段階を示す。即ち、

(1) 潜伏感染期、

(2) コイロサイトの発生に相当する、完全なビリオンの生産を伴う核内ウイルス複製の段階。この段階においてHPVは、E2、E5、E6、E7、L1及びL2を含むその十分な範囲のタンパク質を生産している。

【0009】

(3) 悪性腫瘍形質転換の初まりを誘発し、コイロサイトの次第の消失を伴う、CINII及びCINIII/CISに対応する、細胞ゲノムへのウイルス組込みの段階。この段階において、E2の発現は下降制御され、E6及びE7の発現は増強される。CINII/III及びCINIII/子宮頸癌の間で、ウイルスDNAは基底細胞内でエピソームであったのがE6及びE7遺伝子のみ（腫瘍細胞）の組込みに変化する。全ての子宮頸癌の85%はHPV16血清型に最も支配的に関係する扁平上皮細胞癌である。10%及び5%が各々腺癌及び腺扁平上皮細胞癌であり、両方の型は主に、HPV18血清型に関連する。しかしながら他の発癌性HPVも存在する。

【0010】

国際特許出願WO96/19496は、ヒトバビローマウイルスE6及びE7タンパク質の変異体、特にE6及びE7タンパク質中に欠失があるE6/E7の融合タンパク質を開示する。これらの欠失融合タンパク質は免疫原性と呼ばれる。

本発明は、T細胞エピトープを有する免疫学的融合パートナーに連結したE6もしくはE7又はE6/E7融合タンパク質を含む組成物を供する。

【0011】

。

【0014】

本発明のタンパク質は、好ましい大腸菌内で発現される。好ましい実施形態においてタンパク質は5~9、好ましくは6のヒスチジン残基を含むヒスチジン・テールと共に発現される。これらは精製を助けることにおいて有利である。

タンパク質E7は、好ましい実施形態において、rb部位（網膜芽腫産物）のための結合を減少させるための変異を有する。HPV16 E7のための好ましい変異は、Cys₂₄をグリシンで、グルタミン酸₂₆をグルタミンで置換することに関する。好ましい実施形態において、E7タンパク質はこれらの変異の両方を含む。

【0015】

HPV18 E7のための好ましい変異はCys₂₇をグリシンで及び/又はグルタミン酸₂₉をグルタミンで置換することに関する。また、好ましくは、両方の変異が存在する。

单一又は二重変異も、いずれかの潜在的な形質転換能力を除去するためE6のp53領域に導入することができる。

【0016】

本発明の更なる実施形態において、免疫学的融合パートナーに連結したHPVからのE6/E7融合タンパク質を供する。好ましい免疫学的融合パートナーはプロテインD、より好ましくはプロテインDの最初の1/3である。

本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAも供する。このような配列は適切な発現ベクター内に挿入し、適切な宿主内で発現させることができる。

【0017】

本発明のタンパク質をコードするDNA配列は、標準的なDNA合成技術を用いて例えばD.M.Robertsら（Biochemistry 1985, 24, 5090~5098）により記載される酵素連結により、化学合成により、試験管内酵素重合化により、もしくは例えば熱安定ポリメラーゼを利用するPCR技術により、又はこれらの技術の組合せにより合成することができる。

【0018】

本発明の好ましい形態において、免疫学的融合パートナーは、ヘモフィルスインフルエンザBのプロテインDから得られる。好ましくは、プロテインD誘導体は、そのタンパク質の最初約1/3を含み、特におおよそ最初のN末端100~110アミノ酸を含む。プロテインDは、脂質化され得る（Lipo Protein D）。他の免疫学的融合パートナーには、インフルエンザウイルスからの非構造タンパク質、NS1（ヘマグルチニン）がある。典型的にはN末端81アミノ酸が利用される。但し、それらがTヘルペスエピトープを含むなら、異なるフラグメントを用いることができる。

【0019】

他の実施形態において、免疫学的融合パートナーはLYTAとして知られるタンパク質である。好ましくは、その分子のC末端タンパク質が用いられる。LYTAは、N-アセチル-L-アラニニアミダーゼ、（Lyta遺伝子によりコードされる（Gene, 43 (1986) ページ265~272））アミダーゼLYTA、ペプチドグリカン骨格中の特定の結合を特異的に分解するアートリシンを合成するストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）から得られる。LYTAタンパク質のC末端ドメインはコリン又は特定のコリンアナログ、例えばDEAEに対するアフィニティーの原因である。この特性は、融合タンパク質の発現のために役立つプラスミドを発現する大腸菌C-LYTAの開発のために利用されている。そのアミノ末端にC-LYTAフラグメントを含むハイブリッドタンパク質の精製は開示されている（Biotechnology, 10, (1992) ページ795~798）。本明細書に用いる場合、好ましい実施形態は残基178で始まるC末端内に見い出されるLYTA分子の反復部分を利用する。特に好ましい形態は残基188~305を組み込む。

【0020】

従って、本発明は、好ましい実施形態において、プロテインD-HPV16からのE6、プロテインD-HPV16からのE7、プロテインD-HPV18からのE7、プロテインD-HPV18からのE6並びにプロテインD-HPV16及び18の両方からのE6/E7を含む融合タンパク質を供する。他のHPVサブタイプからの他のE6及びE7タンパク質も利用できることが認められよう

DNAの酵素重合は一般に50μl又はそれ未満の容量で、必要に応じて10~37℃の温度でヌクレオシドトリホスフェートdATP、dTTP、dGTP及びdTTPを含む適切な緩衝液中でDNAポリメラーゼ、例えばDNAポリメラーゼI（クレノウフラグメント）を用いて行うことができる。DNAフラグメントの酵素連結は、適切な緩衝液、例えば0.05M Tris (pH 7.4)、0.01M MgCl₂、0.01Mジチオトレイトール、1mMスペルミジン、1mM ATP及び0.1mg/mlウシ血清アルブミン中で、4℃~環境温度の温度で、一般に50ml又はそれ未満の容量で、T4DNAリガーゼのようなDNAリガーゼを用いて行うことができる。DNAポリマー又はフラグメントの化学合成は、慣用的なホスホトリエヌチド、ホスファイト又はホスホルアミド化により、固相技術、例えば‘Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments-A Laboratory Manual’(ed. H.G.Gassen and A.Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982)、又は他の科学文献、例えばM.J.Gait, H.W.D.Matthes, M.Singh, B.S.Sproat, and R.C.Titmas, Nucleic Acids Research, 1982, 10, 6243; B.S.Sproat, and W.Bannwarth, Tetrahedron Letters, 1983, 24, 5771; M.D.Matteucci and M.H.Caruthers, Journal of the American Chemical Society, 1981, 103, 3185; S.P.Adams et al., Journal of the American Chemical Society, 1983, 105, 661; N.D.Sinha, J.Biernat, J.McMannus, and H.Koester, Nucleic Acids Research, 1984, 12, 4539; and H.W.D.Matthes et al., EMBO Journal, 1984, 3, 801に記載されるものを用いて行うことができる。

【0021】

本発明の方法は、慣用的な組換え技術、例えばManiatisら（Molecular Cloning-a Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, 1982~1989）に記載されるものにより行うことができる。

特に、その方法は、次のステップ：

- i) そのタンパク質又はその免疫学的誘導体をコードするヌクレオチド配列を含むDNAポリマーを宿主細胞内で発現することができる複製可能又は組込み可能な発現ベクターを調製し；

- ii) 該ベクターで宿主細胞を形質転換し；
- iii) その形質転換された宿主細胞を、前記DNAポリマーの発現を許容し前記タンパク質を作り出す条件下で培養し；そして
- iv) 前記タンパク質を回収することを含み得る。

【0020】

用語“形質転換”は、外来DNAの宿主細胞への導入を意味するとして本明細書に用いる。これは、例えば形質転換、トランスフェクション又は適切なプラスミドもしくはウイルスベクターの感染により、例えばGenetic Engineering; Eds. S.M.Kingsman及びA.J.Kingsman; Blackwell Scientific Publications; Oxford, England, 1988に記載されるような慣用的な技術を用いて達成することができる。用語“形質転換”又は“形質転換体”は、以後、関心の外来遺伝子を含み、それを発現する生じた宿主細胞に適用するであろう。

【0021】

好ましくは、本発明の組換え抗原は大腸菌内で発現される。その発現ストラテジーは、T細胞ヘルバーエピトープを供する免疫学的融合パートナーであるヘモフィルスインフルエンザBからのDタンパク質の1／3-N末端部分へのE7、E6又はE6／E7融合物の融合を含む。アフィニティーポリヒスチジン・テールは、融合タンパク質のカルボキシ末端において工作され、簡単な精製を許容する。このような組換え抗原は不溶性タンパク質として大腸菌内で過剰発現される。

【0022】

好ましくは、本発明のタンパク質は、トランスでチオレドキシンと同時発現される。トランス対シスのチオレドキシンの同時発現が、プロテアーゼを必要とすることなく、チオレドキシンを含まない抗原を維持するために好ましい。チオレドキシン同時発現は、本発明のタンパク質の可溶化を容易にする。チオレドキシン同時発現は、タンパク質精製収率、精製されたタンパク質の溶解度及び質に大きな影響を与える。

【0023】

DNAポリマーの発現を許容する条件下での形質転換された宿主細胞の培養は、便利には、例えば上述のManiatisら及び“DNA Cloning”に記載される通り、行われる。これにより、好ましくは、その細胞には栄養素が補給され、50°C未満の温度で培養される。

産物は、宿主細胞に従って慣用的な方法により回収される。これにより、宿主細胞が細菌、例えば大腸菌である場合、それは物理的、化学的又は酵素的に溶解することができ、そのタンパク質産物は生じたライセートから単離することができる。宿主細胞が哺乳動物である場合、その産物は栄養培地から又は無細胞抽出物から単離することができる。慣用的なタンパク質単離技術には、選択的沈殿、吸着クロマトグラフィー、及びモノクローナル抗体アフィニティカラムを含むアフィニティクロマトグラフィーがある。

【0028】

本発明のタンパク質をヒスチジンテール(Hisタグ)と共に発現させる場合、そのタンパク質はイオン金属アフィニティーカラム(IMAC)カラムを用いてアフィニティクロマトグラフィーにより容易に精製することができる。

高度に精製されたタンパク質を生産するために、IMACカラムの前又は後のいずれかに、第2のクロマトグラフィーステップ、例えばQ-セファロースを利用することができる。免疫学的融合パートナーがC-LYTAである場合、この産物を精製するためにコリン及び/又はDEAEについてのC-LYTAのアフィニティーを利用することができる。C-LYTA及びHisタグの両方を含む産物は、示差アフィニティクロマトグラフィーに関する2ステッププロセスにおいて容易かつ効率よく精製することができる。一方のステップはHisタグのIMACカラムへのアフィニティーに関し、他方はコリン又はDEAEについてのLYTAのC末端ドメインのアフィニティーに関する。

【0029】

C-LYTA及びヒスチジンタグの両方を含むタンパク質は新規であり、従って本発明の一態様を形成する。これらは、簡単な2ステップ示差アフィニティー手順により、高レベル(80%超、好ましくは90%超)に精製することができる。

その発現ベクターは新規でありこれも本発明の一部を形成する。

複製可能発現ベクターは、本発明に従って、宿主細胞に適合するベクターを開裂して完全なレブリコンを含む直鎖DNAセグメントを供し、そしてその直鎖セグメントを、その直鎖セグメントと一緒に要求される産物をコードする1又は複数のDNA分子、例えば本発明のタンパク質をコードするDNAポリマー又はその誘導体と、連結条件下で組み合わせることにより調製することができる。

【0024】

これにより、そのDNAポリマーは、必要に応じてベクターの作製の間に前もって形成し又は形成することができる。

ベクターの選択は、原核生物でも真核生物でもよいが好ましくは大腸菌である宿主細胞により部分的に決定されよう。適切なベクターには、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド及び組換えウイルスがある。

【0025】

複製可能発現ベクターの調製は、便利にはDNAの制限、重合及び連結のための適切な酵素と共に、例えば上述のManiatisらに記載される手順により行うことができる。

組換え宿主細胞は、本発明に従って、宿主細胞を本発明の複製可能発現ベクターで形質転換条件下で形質転換することにより調製される。適切な形質転換条件は慣用的であり、例えば上述のManiatisら、又は“DNA Cloning” Vol.II, D.M.Glover ed., IRL Press Ltd, 1985に記載される。

【0026】

形質転換条件は宿主細胞により決定される。これにより、細菌宿主、例えば大腸菌は、CaCl₂の溶液(Cohenら、Proc.Nat.Acad.Sci, 1973, 69, 2110)で、又はRbCl、MnCl₂、酢酸カリウム及びグリセロールの混合物を含む溶液で、次に3-[N-モルホリノ]一プロパンースルホン酸、RbCl及びグリセロールで処理することができる。培養中の哺乳動物細胞は、細胞へのベクター-DNAのカルシウム共沈殿により形質転換することができる。本発明は、本発明の複製可能発現ベクターで形質転換された宿主細胞にも広げられる。

【0027】

本発明のタンパク質は、SDS-PAGEにより可視化して、好ましくは少くとも80%純度、より好ましくは90%純度で供される。そのタンパク質は透元条件下でSDS-PAGEにより分析した場合、主要単一バンドを供し、ウエスタン・プロット分析は、5%未満の宿主細胞タンパク質汚染を示す。

【0030】

本発明は、医薬として許容される賦形剤中に本発明のタンパク質を含む医薬組成物も供する。好ましいワクチン組成物は、少くとも、プロテインローHPV16からのE7と一緒に、プロテインD-HPV16からのE6又はその誘導体を含む。あるいは、E6及びE7は、単一分子、好ましくはプロテインD-E6/E7融合物において供することができる。このようなワクチンは、任意に、HPV18からのE6及びE7タンパク質のいずれか又は両方を、好ましくはプロテインD-E6もしくはプロテインD-E7融合タンパク質又はプロテインD-E6/E7融合タンパク質の形態で含む。本発明のワクチンは、HPV16又は18からの他のHPV抗原を含み得る。特に、本ワクチンは、L1又はL2抗原モノマーを含み得る。あるいは、このようなL1及びL2抗原は、ウイルス様粒子として一緒に供しても、L1単独タンパク質をウイルス様粒子又はキャプソメア構造として供してもよい。このような抗原、ウイルス様粒子及びキャプソメアはそれ自体周知である。例えばWP94/00152, WO94/20137, WO94/05792、及びWO93/02184を参照のこと。付加的な早期タンパク質、例えばE2又は好ましくはE5を含めることができる。本発明のワクチンは、他のHPV株から、好ましくは株HPV6, 11, HPV31又は33からの抗原を更に含み得る。

【0031】

ワクチン調製は、一般に、Vaccine Design-The Subunit and adjuvant approach(Ed. Powell及びNewman) Pharmaceutical Biotechnology Vol.6 Plenum Press 1995に記載される。リボソーム内への被包は、Fullerton、米国特許4,235,875により記載される。

本発明のタンパク質は、好ましくは、本発明のワクチン製剤において補助される。適切なアジュバントは、アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムゲル及

びリン酸アルミニウムを含むが、カルシウム、鉄もしくは亜鉛の塩であっても、又はアシル化チロシン又はアシル化糖、カチオン又はアニオン誘導化ポリサッカライド又はポリホスホファゼンの不溶性懸濁液であってもよい。

【0032】

本発明の製剤において、アジュバント組成物が優先的なTH1応答を誘導することが好ましい。適切なアジュバントシステムは、例えばモノホスホリ脂質A、好ましくは3-de-O-アシル化モノホスホリ脂質A(3D-MPL)の、アルミニウム塩との組合せがある。

増強されたシステムは、モノホスホリ脂質Aとサボニン誘導体との組合せ、特にWO 94/00154に開示されるようなQS 21と3D-MPLとの組合せ、又はQS 21がWO 96/33739に開示されるようにコレステロールで消光されているより少い反応源性の組成物に関する。

【0033】

水中油エマルジョン中のQS 21、3D-MPL及びトコフェロールに関する特に潜在的なアジュバント製剤はWO 95/17210に記載され、それは好ましい製剤である。

従って、本発明の一実施形態において、モノホスホリ脂質A又はその誘導体で補助された、プロテインD(又はその誘導体)ーE 6又はプロテインD(又はその誘導体)ーE 7を含むワクチンを供する。

【0034】

好ましくは、本ワクチンは、サボニン、より好ましくはQS 21を更に含む。

好ましくは本製剤は、水中油エマルジョン及びトコフェロールを更に含む。本発明は、医薬として許容される賦形剤、例えば3D-MPLと一緒に本発明のタンパク質を混合することを含むワクチン製剤を生産するための方法も供する。

本発明は、以下の例を引用することにより更に記述されよう。

【0035】

実施例I：融合タンパク質-D 1/3-E 7-His (HPV16) を発現する大腸菌株の作製

1) 発現プラスミドの作製

ci., 82: 88) に導入した。

3) 細菌株の増殖及び誘導-Protein-D 1/3-E 7-His の発現

プラスミド p R I T 1 4 5 0 1 で形質転換した AR 5 8 の細胞を、30°Cで50 μg/ml のカナマイシンを補給した LB 培地 100 ml 中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を 39°C にシフトしてアレブレッサーを不活性化し、プロテイン D 1/3-E 7-His の合成に向かわせた。39°Cでのインキュベーションを 4 時間、続けた。細胞をベレット化し、-20°Cで保存した。

【0039】

実施例II：融合タンパク質-D 1/3-E 7-His (HPV16) のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10 ml の PBS 缓衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000 psi でフレンチ圧力細胞プレス SLM Aminco で破壊する(3回)。その抽出液を 4°C で 30 分、16,000 g で遠心する。

【0040】

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・プロッティングにより分析した。ベレット画分中にある約 33 kDa の主要バンドをクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結した Ni-NTA コンジュゲート (Qiagen cat. no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルはクーマー染色した SDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約 5% を示す。

【0041】

実施例III：タンパク質-D 1/3-E 7-His (HPV16) 精製

タンパク質-D 1/3-E 7-His を発現する細胞の 1 リッター培養物を 1,300 g で 30 分、4°C で遠心し、細胞ベレットを更なる処理まで -80°C に維持する。7.5 ml PBS 缓衝液中への再度の懸濁の後、大腸菌細胞を 20,000 psi でフレンチ圧力細胞プレス (SLM Aminco (登録商標)) で破壊する。溶解した細胞を 30 分、17,000 g での遠心によりベレット状に

a) プラスミド p MG MCS prot D 1/3 (= p R I T 1 4 5 8 9) はインフルエンザからの N S 1 コーディング領域のコドン 4 ~ 81 がヘモフィルスインフルエンザ株 722、バイオタイプ 2 (H Jansonら、1991, Infectio n and Immunity, Jan. p119-125) の成熟プロテインDの残基 S e r 2 0 → T h r 1 2 7 に相当するコドンにより置換されている (WO 97/01640として公開された UK 特許出願 no 9513261, 9 に記載される) p MG 81 の誘導体である。Prot-D 1/3 の配列の後に多量クローニング部位 (11 残基) 及び C 末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域 (6 His) がある。

【0036】

b) HPV ゲノム E 6 及び E 7 配列タイプ HPV 16 (Dort ら、Virology 1985, 145, p.181 ~ 185 を参照のこと) を、(Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)、Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelberg から得た) p B R 3 2 2 にクローニングした HPV 16 全長ゲノムから増幅し、p U C 1 9 にサブクローニングして T C A 3 0 1 (= p R I T 1 4 4 6 2) を供した。

【0037】

プラスミド T C A 3 0 8 (= p R I T 1 4 5 0 1) の作製：融合タンパク質-D 1/3-E 7-His を発現するプラスミド

E 7 のアミノ酸 1-198 に相当するヌクレオチド配列を p R I T 1 4 4 6 2 から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、Nco I 及び Spe I 制限部位を E 7 配列の 5' 及び 3' 端に作り、プラスミド p MG MCS Prot D 1/3 の同じ部位への挿入を許容してプラスミド T C A 3 0 8 (= p R I T 1 4 5 0 1) を供した。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に変更が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D 1/3-E 7-His (HPV16) についての配列を図 1 に記載する。

【0038】

2) AR 5 8 株の形質転換

プラスミド p R I T 1 4 5 0 1 を λ p L プロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソシンを含む大腸菌 AR 5 8 (Mott ら、1985, Proc.Natl.Acad.S

する。タンパク質-D 1/3-E 7-His を含むベレットを 30 ml の 2 M NaCl、50 mM Phosphate pH7.5 で 1 回、次に 30 ml の 50 mM Phosphate pH7.5 で 2 回、洗う。

【0042】

R T で 30 ml の 8 M 尿素、50 mM ホスフェート pH7.5 中での 2 時間のインキュベーションの後、ホスフェート pH7.5 タンパク質を溶かす。4°C で 17,000 g での 15 分の遠心により細胞デbris を除去する。タンパク質精製を R T で行い、溶解したタンパク質 1.5 ml を、8 M 尿素、50 mM ホスフェート pH7.5 で予め平衡化した 5 mM Ni 2+ + NTA (Qiagen) 樹脂 (Pharmaciaカラム XK 16/20) に、0.2 ml/分の流速で適用する。280 nm の吸光度が基底ラインに達するまで同じ緩衝液で洗う。そのタンパク質を 8 M 尿素、50 mM ホスフェート pH7.5 中の 0-600 mM イミダゾール勾配で溶出する。これらの 2 つの最後のステップの流速を 1 ml/分にする。溶出した画分を SDS-Polycrilic アミドゲル電気泳動により及びウエスタン・プロッティングにより分析する。クーマー染色により、ポリクローナル抗プロテインDにより又はモノクローナル抗 E 7 抗体により可視化した Protein-D 1/3-E 7-His は約 32 kDa の主要単一バンドを示し、95% 純度タンパク質として評価される。ポリクローナル抗大腸菌タンパク質抗体で追跡した大腸菌汚染物は観察されない。

【0043】

尿素を除去するために、1.33 mg/ml の精製抗原 (Bradford) 9 ml を R T で一晩、PBS 缓衝液 3 リッターに対して透析し、次に新しい PBS 缓衝液に対して 4 時間、透析する。80% の無尿素タンパク質を可溶性タンパク質として回収する。汚染しているエンドトキシンを除去するために、6 ml の透析したタンパク質を 1 ml の Affi-prep ポリミキシング (Biorad) と、3 時間、4°C で、静かに攪拌しながらインキュベートした。500 μl の Affi-prep ポリミキシング樹脂との第 2 のインキュベーションを行ってエンドトキシンレベルを 8.8 EU/μg タンパク質に最小化する。0.22 μm フィルター装置 (Millipore 0.22 GV, Millipore) での滅菌ろ過の後、0.665 mg/ml の protein-D 1/3-E 7-His を供する。

3-E7-Hisを安定性のためにアッセイする。SDS-PAGE分析は、-20°C、4°C、RT*又は37°Cにおける7日のインキュベーションの後にタンパク質の進化を示さなかった。

【0044】

実施例IV：融合タンパク質-D1/3-E6-His/HPV16を発現する大腸菌株の作製

1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG_MCS_prot_D1/3 (=pRIT14589) は、インフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4-81がヘモフィルス・インフルエンセ株772、バイオタイプ2 (H.Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan. p.119~125) の成熟タンパク質の残基Ser20→Thr127に相当するコドンにより置換されている (WO 97/01640に記載される) pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位 (11残基) 及びC末端ヒスチジンテール (6His) のためのコドン領域がある。このプラスミドを用いて融合タンパク質D1/3-E6-Hisを発現させる。

【0045】

b) HPVゲノムE6及びE7配列型HPV16 (Seedorfら、*Virology* 1985, 145, p181~185) を、(Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomavirusesから得た) pBR322にクローニングしたHPV16全長ゲノムから增幅した。

c) D69120-HeidelbergをpUC19にサブクローニングしてTCA301 (=pRIT14462) を供する。

【0046】

プラスミドTCA307 (=pRIT14497) の作製：融合タンパク質-D1/3-E6-His/HPV16を発現するプラスミド

E6タンパク質のアミノ酸1→151に相当するスクレオチド配列をpRIT14462から增幅した。ポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE6配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG_MCS_Pro

TA (Qiagen cat no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約5%を示す。

【0050】

5. チオレドキシンとの同時発現

HPV18からのprot-D1/3_E7_Hisの発現 (実施例III) と同様に、大腸菌株AR58をチオレドキシン及びプロテインD1/3_E7_His (HPV16) で形質転換した。

実施例V: Prot-D1/3_E6_His (HPV16) の精製

HPV-16 Prot-D1/3_E6組換え抗原を大腸菌 (AR58) 内で発現させた。発現ストラテジーは、T細胞ヘルパー・エピトープを供する免疫学的融合パートナーであるヘモフィルス・インフルエンセからのプロテインDの1/3-N末端部分へのE6の融合を含んだ。アフィニティーポリヒスチジンテールをその融合タンパク質のカルボキシ末端に工作した。その組換え抗原は不溶性タンパク質として大腸菌内で過剰発現された。

【0051】

抗原の可溶化は変性剤を必要とした。変性剤の次如下で、Prot-D1/3-E6-Hisは中性pHで沈殿した。可溶性の問題を回避するために、これらのタンパク質の、ホールディングパートナーであるトランスのチオレドキシン (Thioredoxin in Trans) (TIT) との同時発現を行った。

細菌の発現はLB培地で、30°Cで0.05mg/mlのカナマイシン及びチオレドキシンを同時に発現する場合、0.2mg/mlのアンビシリントリプトフランの存在下で行う。組換えタンパク質発現は、細胞光学密度 (OD_{600nm}) が0.4に達した時に細胞を42°Cに移すことにより熱的誘導される。タンパク質発現は4時間、維持される。精製は以下のプロトコルに従って行った。

細胞培養ペレット 600D₆₀₀

1mM Pefabloc, 2M NaCl, PBS pH 7.4 (Buffer A)

フレンチプレス粉碎機 3回

20,000psi

D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA307 (=pRIT14497) を作った (図2を参照)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に変化が形成されていないことを確認した。融合タンパク質-D1/3-E6-Hisのためのコーディング配列を図3に記載する。

【0047】

2. AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14497をAR58プロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 82: 88) に導入した。

3. 細菌株の増殖及び誘導-Prot-D1/3-E6-Hisの発現

プラスミドpRIT14497で形質転換したAR58の細胞を、30°Cで50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を39°Cにシフトしてレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6-Hisの合成に向かわせた。39°Cでのインキュベーションを4時間、続けた。細胞をベレット化し、-20°Cで保存した。

【0048】

4. 融合タンパク質D1/3-E6-His (HPV16) のキャラクタリゼーション

抽出物の調製

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液を再度懸濁した。細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amiconで破壊する (3回)。その抽出物を16,000gで30分、4°Cで遠心する。

【0049】

SDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタンプロットでの分析

上の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタン・プロッティングにより分析した。

そのペレット画分にある約32kDaの主要バンドをクーマシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したN-i-N

遠心	17,000g 30分、4°C
ペレット洗浄	2M NaCl, PBS pH 7.4 (Buffer B) ×1
	PBS pH 7.4 (Buffer C) ×2
遠心	17,000g 30分、4°C
ペレット可溶化	6M塩化グアニジン、20mM PO4、pH 7.0 (Buffer D) 一晩、4°C
遠心	17,000g 30分、4°C
IMAC上上の上清	平衡化: 6M塩化グアニジン、20mM PO4、pH 7.0 (Buffer D) 溶出: イミダゾールステップ (0.025M, 0.1M, 0.5M) 8M尿素、20mM PO4、pH 7.0 中

Affiprepポリミキシン

8M尿素、20mM PO4、pH 7.0 (Buffer E)

2h RT*

透析
4M尿素、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO4、pH 6.8 (Buffer I)
2M尿素、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO4 pH 6.8 (Buffer J)
0M尿素、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO4 pH 6.8 (Buffer K)

細胞は、フレンチプレス細胞装置を用いて高圧ホモジナイゼーションにより効率よく破壊される。抗原は高濃度のタンパク質変性剤で抽出する。この最初のステップは細胞壁を破壊し、その細胞の不溶性画分から抗原を抽出する。以下の精製を4リッター培養物で行った。

【0052】

緩衝液

A. PBS/2M NaCl/1mM Pefabloc
 B. PBS/2M NaCl
 C. PBS: 137mM NaCl、2.7mM KCl、8.1mM NaH₂PO₄、1.47mM KH₂PO₄ pH7.4
 D. 6M 塩化グアニジウム、20mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O) / K₂HPO₄ (3H₂O)) pH7.0

出発材料は各々400ml培養物の10のフラスコである。

【0053】

細胞ペーストを Buffer A (この場合、240mlのBuffer A) 中600D₆₀₀に懸濁し、次にフレンチプレス粉碎機に、3回通して細胞を溶解する。溶解した細胞を15,000gで4°Cで30分ベレット状にする。組換えタンパク質を含む細菌の細胞ペレットを240ml Buffer Bで1回、240ml Buffer Cで2回、洗う。

【0054】

Prot-D E6-His (TIT) を回転ホイール上で4°Cで一晩、240ml Buffer Dにより可溶化する。細胞デbrisを4°Cで15,000gで30分、ベレット状にする。上清(230ml)を-20°Cで保存する。次にその材料をIMACクロマトグラフィーにかける。

キレート化リガンドNTA (ニトリロートリーエン酸) をアガロース支持体 (Qiaogen) に結合させる。NTAリガンドにニッケル金属イオンを満たす。それは、そのニッケルの6の配位部位のうち4つを介して相互作用する。ニッケルの残りの2つの配位部位は6×His標識化タンパク質のヒスチジン残基と強力に相互作用する。Ni-NTAと結合しその標識化抗原に置きかわるイミダゾールとの競合により溶出を行う。

【0055】

Hi-NTA Agarose Qiagen (カタログ番号: 30250) を用いた。

溶液

D: 6M 塩化グアニジン、20mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O) / K₂

ミキシンBは高い能力及び選択性でエンドトキシン分子に結合する。

【0059】

溶液

E: 8M 尿素、20mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O) / K₂HPO₄ (3H₂O))、pH7.0 (非発熱性)。

0.5M NaOH

脱イオン非発熱性水

手順

1) Affi-Prep (登録商標) ポリミキシン樹脂を10容量の0.1M NaOH、次に10容量の無発熱物質水で洗う。

【0060】

2) 樹脂を10容量のBuffer Eで平衡化する。

3) 1.5ml (半分をプール) のIMAC溶出サンプルを3mlのAffi-Prep (登録商標) ポリミキシン樹脂と、バッチ・モードでインキュベートする。

4) インキュベーションを、回転ホイール上で4°Cで室温又は0/Nで4時間、追跡する。

【0061】

5) サンプルを2000gで10分、遠心する (Beckman GS-6R)。

6) 抗原を含む上清を収集し、エンドトキシン及びタンパク質アッセイにかける。

7) 樹脂を捨てる。

小分子は半透膜を介して拡散するが、大きな分子は保持される。透析の過程はその膜の2つの側上の溶質の濃度の差により駆動される。各々の側の緩衝組成物が平衡になるまで、新しい溶液を導入する。

【0062】

緩衝液

I: 4M 尿素、0.5M アルギニン、0.15M NaCl、10mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O) / K₂HPO₄ (3H₂O)) pH6.8

J: 2M 尿素、0.5M アルギニン、0.15M NaCl、10mM PO₄ (

HPO₄ (3H₂O))、pH7.0

E: 8M 尿素、20mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O) / K₂HPO₄ (3H₂O))、pH7.0

F: E+0.025Mイミダゾール

G: E+0.1Mイミダゾール

H: E+0.5Mイミダゾール

0.5M NaOH

脱イオン水

0.02% NaN₃

精製

a) 樹脂 (1.5ml樹脂/230mlサンプル) を充填し、1.5cm⁻¹で10カラム容量(C.V.)のBuffer Dで平衡化する。

【0056】

b) 可溶化画分からの上清を1.5cm⁻¹でそのカラムに注入する。

c) OD 28nmがベースラインに戻るまでカラムをBuffer Dで1.5cm⁻¹で洗う。

d) カラムを1.5cm⁻¹で2CVのBuffer Eで洗う。その洗浄画分を回収する。

【0057】

e) カラムを最初に5CVのBuffer Fで溶出する。2.5kD主要汚染物を除去する。

f) 次にカラムを2CVのBuffer Gで溶出する。

g) カラムを最後に3CVのBuffer Hで溶出する。抗原を溶出する。

抗原陽性画分をプールする (30ml)。

【0058】

エンドトキシンをAffi-Prepクロマトグラフィーにより除去する。

Affi-Prep (登録商標) ポリミキシン支持体は、Affi-Prep (登録商標) Matrixに結合したUSPグレードPolymyxin Bからなる。そのエンドトキシンの脂質A成分への高いアフィニティーにより、ポリ

NaH₂PO₄ (2H₂O) / K₂HPO₄ (3H₂O)) pH6.8

K: 8M 尿素、0.5M アルギニン、0.15M NaCl、10mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O) / K₂HPO₄ (3H₂O)) pH6.8

1) サンプル (1.5ml) を透析管材 (20.4mm直徑及び6cmの高さ) に導入する。

【0063】

2) 透析管材を、2時間、4°Cで攪拌しながら、Buffer Iを含む2リッターシリンダーに入れる。

3) 透析管材を、2時間、4°Cで、Buffer Jを含む2リッターシリンダー (攪拌下) に入れる。

4) 透析管材を、4°CのO/Nで、(攪拌下) Buffer Kを含む2リッターシリンダーに入れる。

【0064】

Millipore Sterile Millex-GV 0.22μ、13mm。カタログ番号: SLGV0130S。

全てのステップは室温 (RT ≈ 22°C) で行う。抗原は安定であるようである。

抗原溶液は0.2μmフィルターを通してろ過し、いずれの細菌増殖も防ぐ。抗原はNunc容器中で-20°Cで維持する。

【0065】

キャラクタリゼーション:

タンパク質D1/3-E6-Hisは次の通りキャラクタライズする。

タンパク質D1/3-E6-HisはプロテインD部分からの112アミノ酸を伴うこの3アミノ酸長ペプチドである。タンパク質D1/3-E6-Hisは32kDの理論分子量を有し、SDS-PAGEで33kDタンパク質として移動する。タンパク質D1/3-E6-Hisの理論等電点は8.17である。

【0066】

ウイルスのプロテインE6は14のシスティン残基を含む塩基性タンパク質であり、そのシスティン残基のうちの8つ (Cys 30, 33, 63, 66及びC

γ s 103, 106, 136, 139) は2つのC末端の亜鉛結合モチーフに関与している。

タンパク質D1/3-E6-Hisは、ホールディングパートナーであるトランスのチオレドキシンと共に、大腸菌AR58株内で不溶性タンパク質として発現される。細胞培養は400mlフラスコで行う。

【0067】

1リッターの培養で5.4mgの95%純度のタンパク質が得られる。

実施例VI：融合タンパク質-D1/3-E6-E7-His/HPV16を発現する大腸菌株の作製

1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) は、インフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4-81がヘモフィルス・インフルエンセ株772、バイオタイプ2(H.Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan, p.119~125) の成熟プロテインDの残基Ser20-Thr127に相当するコドンにより置換されている(上述の)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテール(6His)のためのコドン領域がある。このプラスミドを用いて融合タンパク質D1/3-E6-E7-Hisを発現させる。

【0068】

b) HPVゲノムE6及びE7配列型HPV16 (Seedorfら、*Virology* 1985, 145, p181~185) を、(Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomavirusesから得た)pBR322にクローニングしたHPV16全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローニングしてTCA301 (=pRIT14462) を供する。

【0069】

c) TCA301 (=pRIT14462) 内のE6及びE7のためのコーディング配列を、(Affffl 及びNsiI 部位の間に挿入された)合成オリゴヌクレオチドアダプターで改変し、E6及びE7遺伝子の間の5ヌクレオチドの欠失を導入してE6の終止コドンを除去し、プラスミドTCA309 (=pRIT

上述の抽出物の還心の後、上清及びペレットのアリコートを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。

【0073】

そのペレット画分にある約48kDaの主要バンドをクーマーシー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ脳アルカリロスファターゼに連続したNi-NTA (Qiagen cat no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約1%を示す。

【0074】

実施例VIb：

同様に、HPV16からのLipo-D1/3及びE6-E7の融合タンパク質をチオレドキシンの存在下で大腸菌中で発現させた。プレタンパク質(388aa)のN末端は、MDP残基及び次に(ヘモフィルス・インフルエンセからの)リボプロテインDのシグナルペプチドの16アミノ酸を含み、それは生体内で開裂されて成熟タンパク質(370aa)を供する。リボプロテイン部分(aa1~127)の後に、融合したタンパク質E6及びE7がある。そのタンパク質のC末端にはTSGHHHHHHが延長している。

【0075】

そのタンパク質を次のプロトコルにより精製した：

実施例VII：リボプロテインD1/3-E6-E7-His (TIT) 精製

A) 可溶化

細胞ベーストをプロテアーゼインヒビターとして1mM Pefablocの存在下で2M NaCl、20mMホスフェート(NaH₂PO₄/K₂HPO₄) 中で600D₆₀₀まで懸濁し、次にフレンチプレス粉碎機(20, 000psi)に3回通して細胞を溶解する。溶解した細胞を4°Cで15, 000gで30分、ペレット状にする。エンドトキシンレベルを減少させるために、粗挽えタンパク質を含む細胞ペレットを4M尿素、2M NaCl、20mMホスフェートpH7.5で2回、2% Empigen BB、20mMホスフェートpH7.5で1回、及び最後に20mMホスフェート緩衝液pH7.0で2回、洗って微量の洗剤を除去

14556)内に融合化E6及びE7コーディング配列を作る。図4を参照のこと。

【0070】

プラスミドTCA311 (=pRIT14512) の作製：融合タンパク質-D1/3-E6-E7-His/HPV16を発現するプラスミド

融合化E6-E7タンパク質のアミノ酸1→249に対応するヌクレオチド配列をpRIT14556から增幅した。ポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSphI制限部位をE6-E7融合化配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMGMCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA311 (=pRIT14512) を供した(図5を参照のこと)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に変更がおこっていないことを確認した。融合タンパク質D1/3-Hisのためのコーディング配列を図6に記載する。

【0071】

2. AR58株の形質転換

プラスミドpRIT14512をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 82: 88) に導入した。

3. 細菌株の増殖及び誘導-Prot-D1/3-E6-E7-Hisの発現

プラスミドpRIT14512で形質転換したAR58の細胞を、30°Cで50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を39°Cにシフトしてメプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6-E7-Hisの合成に向かわせた。39°Cでのインキュベーションを4時間、続けた。細胞をペレット化し、-20°Cで保存した。

【0072】

4. 融合タンパク質D1/3-E6-E7-Hisのキャラクタリゼーション
凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁した。細胞を20, 000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincで破壊する(3回)。その抽出物を16, 000gで30分、4°Cで遠心する。

する(各々の洗浄は、細胞懸濁に用いたのと同じ容量で行う)。LipoProt D1/3-E6-E7-His (TIT) を、0.2M β-メルカプトエタノール(=βMeOH)、20mM PO4 pH12中の8M尿素により(細胞懸濁に用いたのと同量)4°Cで一晩で溶かし、次にRTで同じ緩衝液中で2時間、インキュベートする。細胞デbrisを4°Cで15, 000gで30分、ペレット状にする。上清を-20°Cに維持する。

【0076】

B) 精製

1) Q-Sepharoseファーストフローでのアニオン交換クロマトグラフィー

2.25mlの凍結サンプルを冷水浴中で室温で解凍し、8M尿素、0.2M βMEOH、20mM PO4 pH12で予め平衡化したQ-Sepharoseファーストフローカラム(Pharmacia, XK 26/20)(30ml樹脂/22.5ml上清)に4.5cm/hで適用する。OD280nmがベースラインに達するまで、カラムを8M尿素、0.2M βMEOH、20mM PO4 pH12により洗い、次に8M尿素、20mMホスフェートpH12(2カラム容量)で第2の洗浄を行う。8M尿素、20mMホスフェートpH12中のNaClのステップ(0.1M, 0.25M, 0.5M NaCl、各々のステップは約2カラム容量)により4.5cm/hで溶出を行う。0.5M NaClで溶出した画分をプールする。

【0077】

2) イオン金属アフィニティクロマトグラフィー(IMAC)

Q-Sepharoseステップから0.5M NaClで溶出した画分をプールし、0.2M NaCl、8M尿素、20mMホスフェートpH10に対して透析し、次に8M尿素、20mM PO4 pH12で予め平衡化したNi2+-NTA (Qiagen) カラム(XK 26/20, Pharmacia)(30ml樹脂/6.1mlサンプル)に5.6cm/hで充填する。ベースラインに達するまでカラムを8M尿素、20mM PO4 pH12で洗い、次に8M尿素、20mM PO4 pH10で洗う。抗原を4.5cm/hで、8M尿素中のイミダゾールステップ(0.025M, 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2M, 0.5Mイミダゾール; 各々の

ステップは2カラム容量)により溶出する。0.05Mイミダゾールで溶出した画分をプールする。

【0078】

C) 濃縮

ImacサンプルをRT[°]で、AMICONからの攪拌セル中の5kDa Filter n Omega膜で約5倍に(0.407mg/mlに)濃縮する。

D) 透析

濃縮したサンプルを、0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO₄ pH6.8中減少する尿素濃度ステップ(4M、2M尿素)に対してRTで透析する。0.5Mアルギニン、150mM NaCl、10mM PO₄ pH6.8に対する最後の透析を4°Cで行う。

【0079】

結果:

IMACステップは、0.025Mイミダゾールで32kD汚染物を除すことができ、特定の抗原も溶出した。0.05Mイミダゾール溶出抗原はSDS-PAGEのクーマシブルー染色により90%純度と評価される。これらの2つの精製ステップの後、サンプルは大腸菌汚染物を含まない。特定の抗原-N及び/C末端抗体を用いるウエスタン・ブロッティング分析は、全長タンパク質より高い及び低いMWのバンドの不均一パターンを示す。このパターンは、全長タンパク質と同時に精製された、凝集物及び不完全に処理されたタンパク質及び/又は分解したものの存在を示す。

【0080】

実施例VIII: 融合Prot-D1/3-E7変異(cys24→glu, glu26→glu)型HPV16を発現する大腸菌株B1002の作製

1) 発現プラスミドの作製

出発材料:

a) 融合Prot-D1/3-E7-HisをコードするプラスミドpRIT14501(=TCA308)

b) クローニングベクター-pUC由来のプラスミドLITMUS28(New En

n)-His/HPV16を発現する株B1002の作製

プラスミドpRIT14733をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌AR58(Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88)に導入してカナマイシンに対して耐性の形質転換体についての選択により株B1002を供した。

【0083】

3) 細菌株B1002の増殖及び誘導-Prot-D1/3-E7変異(cys24→glu, glu26→glu)-His/HPV16の発現

プラスミドpRIT14733で形質転換したAR58の細胞(B1002株)を30°Cで、5.0 μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を39°Cにシフトしてレプレッサーを不活性化し、Prot-D1/3-E7変異His/HPV16の合成に切りかえた。39°Cでのインキュベーションを4時間、続けた。細胞をベレット状にし、20°Cで保存した。

【0084】

4) 融合Prot-D1/3-E7変異(cys24→glu, glu26→glu)-His型HPV16のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、1.0mlのPBS緩衝液に再度懸濁した。細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊した(3回)。その抽出物を16,000gで30分、4°Cで遠心した。

【0085】

上述の抽出物の遠心の後、上清及びベレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。

そのベレット画分にある約33kDaの主要バンドをクーマシ染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル22J70抗プロテインDにより、Zymedからのモノクローナル抗E7/HPV16により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNTA(Oregon cat no 34510)によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約3~5%を示す。

gland Biolabs cat no 306~28)

c) ヘモフィルスインフルエンザ株722、バイオタイプ2(H.Jansonら、1991, Infection and Immunity, Jan. p.119~125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に対応するコドンにより、インフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4→81が置換されているpMG81(上述)の誘導体であるプラスミドpMG MCS Prot D1/3(pRIT14589)、Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。

【0081】

プラスミドpRIT14733(=TCA347)の作製: Hisテールを有する融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys24→glu, glu26→glu)を発現するプラスミド

Hisテールが伸長したHPV16からのE7遺伝子のコーディング配列を有するpRIT14501(=TCA308)からのNcoI-XbaIフラグメントを変異誘発のために役立つ中間ベクター-Litmus28にサブクローニングしてpRIT14909(=TCA337)を供した。網膜芽細胞遺伝子の癌抑制遺伝子産物への結合を妨害するために二重変異:cys24→glu(Edmonds及びVosden, J.Virology 63: 2650 (1989))及びglu26→glu(Phelpsら、J.Virology 66: 2418 ~27 (1992))を選択した。E7遺伝子中の変異の導入は、キット"Quick Change Site directed Mutagenesis (Stratagene cat no 200518)"で実現し、プラスミドpRIT14681(=TCA343)を供した。配列決定により変異の存在及び完全なE7遺伝子の組込みを確認した後、変異したE7遺伝子をベクター-pRIT14589(=pMG MCS Prot D1/3)に導入してプラスミドpRIT14733(=TCA347)を供した(図7)。

【0082】

融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys24→glu, glu26→glu)-Hisについての配列を図8に示す。

2) Prot-D1/3-E7変異(cys24→glu, glu26→glu)

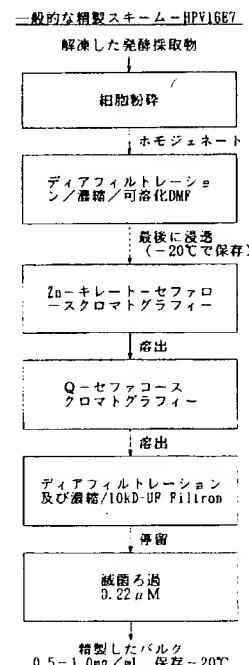
【0086】

B1002の細胞を遠心により培養液から分離した。B1002の濃縮細胞を-65°Cに保存した。

実施例IX: PROT-D1/3-E7(Dmutant) HPV16の精製

【0087】

【表1】



【0088】

a) 細胞懸濁液の調製

B1002の凍結濃縮細胞を解凍し、(約25g DCWL⁻¹)の細胞濃度に相当する)60の最終的光学密度OD₆₅₀まで+4°Cで細胞粉碎緩衝液(表1を参照)に再度懸濁した。

b) 細胞粉碎

細胞を、高圧ホモジナイザー(Rannie)に1000barで2回通すことにより粉碎した。その粉碎した細胞懸濁液を4°Cに維持したフラスコに収集した。

【0089】

細胞粉碎緩衝液: 3N HClでpHを7.5に調節したNa₂HPO₄(0.02N)、NaCl(2M)

精製

2a) 動的膜ろ過(DMF(登録商標)一PALL FIVTRON)

2リッターの粉碎した細胞懸濁液(OD60)を、0.2μmカットオフ膜を備えたPALLからの動的ろ過システム、DMF(登録商標)に充填する。

【0090】

2リッターから1リッターに濃縮してサンプルPCC1を供し、

empigen-EDTA緩衝液(濃度EDTA 1.86g、Empigen(30%) 3.33ml、PO₄³⁻ 0.5M 40.00ml)の3容量(3L)で一定容量で洗ってサンプルを供し、

1Lから300mlに濃縮してサンプルPCC2を供し、

empigen緩衝液(濃度L-1: Empigen 30%、3.33ml、PO₄³⁻ 0.5M 40ml) pH7.5の10容量(3L)で一定容量で洗ってサンプルを供し、

同じ容量(300ml)の塩酸グアニジン8M緩衝液(濃度L-1: Gu. HCl 764g; Empigen 30%、3.33ml、PO₄³⁻ 0.5M 40ml)

pH7.5を加えてタンパク質を可溶化し、
タンパク質を回収する: 最初の容量(300ml)への濃度及び3容量の塩酸グアニジン4M緩衝液(濃度L-1: Gu. HCl 328.12g; Empigen(30%) 3.33ml PO₄³⁻ 0.5M 40.00ml) pH7.5でのディ

24g PO₄³⁻ 0.5M 40.00ml)で洗い—サンプルQS-W1

empigenを含まない尿素6M緩衝液約10容量(尿素360.36g/L)で洗い—サンプルQS-W2

約5容量の尿素6M-NaCl 200mM緩衝液(濃度L-1: 尿素360.36g NaCl 11.69g、40.00ml PO₄³⁻)で溶出し、

約3容量の尿素6M-NaCl 500mM緩衝液(先と同じだがNaCl 29.22g/L)で溶出し、画分の正確な終りをUVピークにより決定し—サンプルQS-S-500

4容量の尿素4M-NaCl/M緩衝液(濃度L-1: 尿素360.36、NaCl 15.8.44g、40.00ml PO₄³⁻ (0.51))で溶出する—サンプルQS-S-1M

次にカラムをNaOH 0.5Mで洗う。

【0094】

QS-セファロース溶出物(QS-S-500)は次の精製ステップまで2~8°Cの間に保存する。

Q-セファロースクロマトグラフィー作業は室温で行う。

2d) 限外ろ過

次にQS-S-500画分を10kD限外ろ過ユニット(Ultrasette-Pall Filter)で処理する。

【0095】

産物を最初に約1mg/mlのタンパク質に濃縮し、次に10容量のホスフェート緩衝液に対してディアフィルトレーションする。

浸透物(画分UF-P)を捨て、停滞物(画分UF-R)を最後のろ過まで2~8°Cで保存する。

限外ろ過作業は2~8°Cで行う。

【0096】

2e) 最終的なろ過

最後のバルク(UF-R画分)を層流下で無菌クラス100室で0.22μm滅菌フィルター(Millipak-Millipore)でろ過する。最終濃度は0.5~1.0

アフィルーションの間に浸透物サンプルP3を収集。

【0091】

これら全てのステップは、冷室(2~8°C)で0.5M PO₄³⁻で調製したpHで行う。

P3画分は次の精製ステップまで-20°Cで保存する。

2b) Zn-キレート化セファロースクロマトグラフィー

P3画分を解凍し、充填し、平衡化したZnキレート化セファロースFFに注入する。

【0092】

その後、そのカラムを、

約3容量の塩酸グアニジン4M緩衝液(上述)で洗い—サンプルZn-FT

約5容量の尿素4M緩衝液(濃度L-1: 尿素240.24g Empigen

3.33ml、PO₄³⁻ 0.5M 40.00ml)で洗い—サンプルZn-W/
上述と同じであるが、イミダゾール34.04gの濃度である約3容量の尿素4M-イミダゾール20mM緩衝液(濃度L-1: 尿素240.24g Empigen(30%) 3.33mlイミダゾール(1.36g) PO₄³⁻ 0.5M 40.00ml pH7.5)で溶出し—サンプルZn-20

尿素4M-イミダゾール50.00mMでUVピークの終りまで溶出する—サンプルZn-500

カラムをEDTA 50mM及びNaOH 0.5Mで洗う。Znキレート化セファロース溶出液(Zn-500)を次の精製ステップまで2~8°Cで保存する。

【0093】

Znキレート化セファロースクロマトグラフィーの作業は室温で行う。

2c) Q-セファロースクロマトグラフィー

Zn-500画分を、充填し平衡化したQ-セファロースFFに注入する。

その後、カラムを、約7容量の尿素4M緩衝液(上述)で洗い—サンプルQS-FT

empigenを含まない尿素4M緩衝液約10容量(濃度L-1: 尿素240.

μg/ml)である。その滅菌バルクを-20°Cに保存する。

実施例X: 融合cIyt-a-E6-His(HPV16)を発現する大腸菌株の作製

1. 発現プラスミドの作製

a) 融合Prot D1/3-E6-His/HPV16をコードするプラスミドpRIT14497(=TCA307)

b) ストレプトコッカス・ニューモニエのLytAの117C末端コドンについてのコーディング配列を含む中間体ベクターであるプラスミドpRIT14661(=DVA2)。LytAは、N-アセチル-L-アラニニアミダーゼ、(LytA遺伝子(Gene, 43(1986)p265~272)によりコードされるアミダーゼLYTA、ペプチドグリカン骨格中の特定の結合を特異的に分解するオートリシンを合成するシュードモナス・ニューモニエから得られる。LYTAタンパク質のC末端ドメインはコリン又はDEAEのような特定のコリンアナログに対するアフィニティーの原因である。

【0097】

1. b) プラスミドpRIT14634(=TCA332)の作製: 融合cIyt-a-E6-His/HPV16を発現するプラスミド

a) 最初のステップは、プラスミドpRIT14497からの大きなNcoI-AfIII制限フラグメントの精製及びpRIT14661からの小さなAfII-AfIII制限フラグメントの精製であった。

【0098】

b) 第2のステップは、pLプロモーターの制御下で融合タンパク質cIyt-a-E6-HisをコードするプラスミドpRIT14634(=TCA332)を作り出す、E7-His配列へのcIyt-a配列の連結(NcoI及びAfIIIは適合性制限部位である)であった(図9参照)。

融合タンパク質cIyt-a-E6-Hisのためのコーディング配列を図10に記載する。

【0099】

AR58株の形質転換

プラスミド pRIT14634 を λpL プロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失メソジンを含む大腸菌 AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88) に導入した。

細菌株の増殖及び誘導—cIyta-E6-His の発現

プラスミド pRIT14634 で形質転換した AR58 の細胞を、30°Cで50 μg/ml のカナマイシンを補給した LB 培地 100ml 中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を 39°C にシフトしてレプレッサーを不活性化し、cIyta-E6-His の合成に向かわせた。39°C でのインキュベーションを 4 時間、続けた。細菌をペレット化し、-20°C で保存した。

【0100】

4. 融合 cIyta-E6-His のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10ml の PBS 緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20, 000psi でフレンチ圧力細胞プレス SLM Aminoで破壊する(3回)。その抽出液を 4°C で 30 分、16,000g で遠心する。上述の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・プロッティングにより分析した。

【0101】

ペレット画分中にある約 33kDa の主要バンドをクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギボリクローナル抗 cIyta 抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結した N-NTA コンジュゲート (Qiagen cat. no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルはクーマー染色した SDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約 3% を示す。

【0102】

実施例 XI：融合 cIyta-E7-His (HPV16) を発現する大腸菌株の作製

1. 発現プラスミドの作製

1. a. 出発材料

a) 融合 Protein D1/3-E7-His/HPV16 をコードするプラスミド

4. 融合 cIyta-E7-His のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10ml の PBS 緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20, 000psi でフレンチ圧力細胞プレス SLM Aminoで破壊する(3回)。その抽出液を 4°C で 30 分、16,000g で遠心する。上述の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートを SDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約 3% を示す。

【0107】

ペレット画分中にある約 35kDa の主要バンドをクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギボリクローナル抗 cIyta 抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結した N-NTA コンジュゲート (Qiagen cat. no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルはクーマー染色した SDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約 5% を示す。

【0108】

実施例 XII：融合 cIyta-E6E7-His (HPV16) を発現する大腸菌株の作製

1. 発現プラスミドの作製

1. a. 出発材料

a) 融合 Protein D1/3-E6E7-His/HPV16 をコードするプラスミド pRIT14512 (=TCA311)

b) ストレプトコッカス・ニューモニエの LytA の 117C 末端コドンについてのコーディング配列を含む中間体ベクターであるプラスミド pRIT14661 (=DVA2)。

【0109】

1. b. プラスミド pRIT14629 (=TCA331) の作製：融合 cIyta-E6E7-His/HPV16 を発現するプラスミド

a) 最初のステップは、プラスミド pRIT14512 からの大きな NcoI-AfIII 制限フラグメントの精製及び pRIT14661 からの小さな AfII-AfIII 制限フラグメントの精製であった。

ミド pRIT14501 (=TCA308)

b) ストレプトコッカス・ニューモニエの LytA の 117C 末端コドンについてのコーディング配列を含む中間体ベクターであるプラスミド pRIT14661 (=DVA2)。

【0103】

1. b. プラスミド pRIT14626 (=TCA330) の作製：融合な cIyta-E7-His/HPV16 を発現するプラスミド

a) 最初のステップは、プラスミド pRIT14501 からの大きな NcoI-AfIII 制限フラグメントの精製及び pRIT14661 からの小さな AfII-AfIII 制限フラグメントの精製であった。

【0104】

b) 第 2 のステップは、pL プロモーターの制御下で融合タンパク質 cIyta-E7-His をコードするプラスミド pRIT14626 (=TCA330) を作り出す、E7-His 配列への cIyta 配列の連結 (NcoI 及び AfIII は適合性制限部位である) であった (図 11 参照)。

融合タンパク質 cIyta-E7-His のためのコーディング配列を図 12 に記載する。

【0105】

2. AR58 株の形質転換

プラスミド pRIT14626 を λpL プロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失メソジンを含む大腸菌 AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88) に導入した。

3. 細菌株の増殖及び誘導—cIyta-E7-His の発現

プラスミド pRIT14626 で形質転換した AR58 の細胞を、30°C で 50 μg/ml のカナマイシンを補給した LB 培地 100ml 中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を 39°C にシフトしてレプレッサーを不活性化し、プロテイン cIyta-E7-His の合成に向かわせた。39°C でのインキュベーションを 4 時間、続けた。細菌をペレット化し、-20°C で保存した。

【0106】

【0110】

b) 第 2 のステップは、pL プロモーターの制御下で融合タンパク質 cIyta-E6E7-His をコードするプラスミド pRIT14629 (=TCA331) を作り出す、E7-His 配列への cIyta 配列の連結 (NcoI 及び AfIII は適合性制限部位である) であった (図 #13 参照)。

融合タンパク質 cIyta-E6E7-His のためのコーディング配列を図 14 に記載する。

【0111】

2. AR58 株の形質転換

プラスミド pRIT14629 を λpL プロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失メソジンを含む大腸菌 AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88) に導入した。

3. 細菌株の増殖及び誘導—cIyta-E6E7-His の発現

プラスミド pRIT14629 で形質転換した AR58 の細胞を、30°C で 50 μg/ml のカナマイシンを補給した LB 培地 100ml 中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を 39°C にシフトしてレプレッサーを不活性化し、プロテイン cIyta-E6E7-His の合成に向かわせた。39°C でのインキュベーションを 4 時間、続けた。細菌をペレット化し、-20°C で保存した。

【0112】

4. 融合 cIyta-E6E7-His のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10ml の PBS 緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20, 000psi でフレンチ圧力細胞プレス SLM Aminoで破壊する(3回)。その抽出液を 4°C で 30 分、16,000g で遠心する。

上述の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・プロッティングにより分析した。

【0113】

ペレット画分中にある約 35kDa の主要バンドをクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギボリクローナル抗 cIyta 抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結した N-NTA コンジュゲート (Qiagen cat. no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。

NTAコンジュゲート (Qiagen cat. no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約1%を示す。

【0114】

実施例XIII: Prot D1/3-E7-His (HPV18) (大腸菌B1011)

トランスのチオレドキシンと共に発現されるタンパク質D1/3-E7-His HPV

1) 発現プラスミドの作製

1) a. 融合タンパク質-D1/3-E7-His/HPV18を発現するプラスミドであるプラスミドTCA316 (=pRIT14532) の作製

出発材料

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81がヘモフィルスインフルエンザ株772、バイオタイプ2 (H Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan, p119-125) の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に相当するコドンにより置換されている (WO 97/01640として公開されたUK特許出願no 9513261, 9に記載される) pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位 (11残基) 及びC末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域 (6His) がある (図15を参照)。このプラスミドを融合タンパク質D1/3-E7-Hisを表現させるのに用いる。

【0115】

b) 原型HPV18のHPVゲノムE6及びE7配列 (Coleら、J.Mol.Biol. (1987) 193, 599~608) を、(Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelbergから得た) pBR322にクローニングしたHPV16全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローニングしてTCA302 (=pRIT14467) を供した。

【0116】

TCA316 (=pRIT14532) の作製

2) AR58株の形質転換

2) a. Prot D1/3-E7-His/HPV18を発現する株B1011を得ること

プラスミドpRIT14532を、カナマイシンに耐性の形質転換体についての選択により、λpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失メリソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci. 82: 88) に導入した。

【0119】

2) b. Prot D1/3-E7-His/HPV18及びチオレドキシンを発現する株B1012の作製

プラスミドpRIT14532及びpRIT14523を、カナマイシン及びアンビシリンに耐性である形質転換体のための二重選択により、λpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失メリソゲンを含む大腸菌AR58 (Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci. 82: 88) に導入した。

【0120】

3) 細菌株B1011の増殖及びトランスのチオレドキシンあり及びなしのProt-D1/3-E7-His/HPV18の発現

プラスミドpRIT14532で形質転換したAR58の細胞 (B1011株) 並びにプラスミドpRIT14532及びpRIT14523で形質転換したAR58の細胞 (B1012株) を、30°CでB1011株について50μg/mlのカナマイシンを補給し、B1012株について50μg/mlのカナマイシン及び100μg/mlのアンビシリンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39°Cにシフトしてレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E7-His/HPV18の合成に向かわせた。39°Cでのインキュベーションを4時間、続けた。細菌をペレット化し、-20°Cで保存した。

【0121】

融合タンパク質D1/3-E7-His/HPV18のキャラクタリゼーション

E7のアミノ酸1-105に相当するヌクレオチド配列をpRIT14467から増幅した。そのボリメラーゼ鎖反応の間、Nco I及びSpe I制限部位をE7配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA316 (=pRIT14532) を供した。その挿入物を配列決定して変換E7/HPV18原型配列を、グルタミン酸によるグリシンの置換 (E7中のaa43、融合タンパク質中の位置156) を作り出すE7遺伝子 (スクレオチド128G→A) 中で同定した。その融合タンパク質-D1/3-E7-His/HPV16についての配列を図16に記載する。

【0117】

1) b. プラスミドTCA313 (=pRIT14523) の作製: チオレドキシンを発現するプラスミド

出発材料

a)複製のCol E1又はP15a起点を含むプラスミドと適合可能であるプラスミドpBBR1MC S4 (Antoine R 及びC.Locht, Mol.Microbiol. 1992, 6, 1785~1799; M.E.Kovachら、Biotechniques 16 (5), 800~802)

b) ラムダファージのプロモーターpLを含むプラスミドpMG42 (WO 93/04175に記載)

c) チオレドキシンのためのコーディング配列及び次にAspA転写ターミネーターを有するプラスミドpTRX (Invitrogen, Kit Thiofusion K350-01)

プラスミドTCA313 (=pRIT14523) の作製

pLプロモーターを有するpMG42からのフラグメントEcoRI-NdeIフラグメント、及びチオレドキシンのコーディング配列の後にAspAターミネーターを有するpTRXからのNdeI-HindIIIフラグメントを精製し、プラスミドベクターpBBR1MC S4のEcoRI及びHindIII部位に連結してプラスミドTCA313 (=pRIT14523) を供した (図17を参照)。

【0118】

チオレドキシンについての配列を図18に記載する。

抽出物の調製

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する (3回)。その抽出液を4°Cで30分、16,000gで遠心する。

【0122】

SDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタン・プロットでの分析

上の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・プロッティングにより分析した。

融合prot D1/3-E7-His (約31kDa) を、株B1011についてペレット画分中で株B1012について上清中に局在化した (30%) 画分でクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結したNi-NTAコンジュゲート (Qiagen cat. no 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルはクーマー染色したSDS-ポリアクリルアミドゲル上に示される通り、全タンパク質の約1~3%を示す。

【0123】

株B1012の抽出のために、チオレドキシン (約1.2kDa) を上清中のクーマー染色したゲルにより可視化し、モノクローナル抗チオレドキシン (Invitrogen R920-25) によりウエスタンプロットで同定した。

Prot D1/3-E7-his/HPV18の精製

組換えHPV18-Prot D1/3-E7-Hisを (上述の) 大腸菌AR58株内で発現させる。全てのステップを室温 (RT=22°C) で行う。タンパク質はOD_{280nm}をモニターすることにより追跡する。ステップの間、抗原陽性画分は-20°Cに維持する。

【0124】

精製した抗原は-20°C及び4°Cで1週間、安定である (分解しない) が、37°Cでのインキュベーション後により酸化しやすいようである。

d) 溶解度

タンパク質溶解度はpH<7、4で溶解度が減少し、pH依存性である：

PBS pH7.4	686 μg/ml	100%
PBS pH7.2	560 μg/ml	81%
PBS pH7.0	498 μg/ml	72%
PBS pH6.8	327 μg/ml	48%

e) HPV18 Prot D1/3-E7タンパク質は227アミノ酸から構成される。その理論分子量は25.9kDaであり、5.83の理論等電点である。それは還元SDS-PAGEにおいて約31.5kDaに動く。

【0125】

実施例XIV：HPV18タンパク質D1/3-E7の精製

a) 可溶化

細胞ペーストを2M NaCl、20mMホスフェート(NaH₂PO₄/K₂HPO₄)pH7.6中60OD₆₀₀に懸濁し、その後、Rannnie粉碎機に2回通すことにより細胞を溶解させる。溶解した細胞を4°CでJA10ローター内で9,000rpmで30分、ベレット化する。エンドトキシンレベルを減少させるために、粗換えタンパク質を含む細胞細胞ペレットを5mM EDTA、2M NaCl、PBS pH7.4で1回；4M尿素、20mMホスフェートpH7.4中で1回、そして最後にPBS pH7.4中で1回洗って微量のEDTAを除去する（各々の洗浄は、細胞懸濁のために用いる容量の2倍で行う）。HPV18-Prot.D1/3-E7-His（トランスのチオレドキシンについてTT）を6M塩化アミニン、50mM PO₄pH7.6により一晩、4°Cで（細胞懸濁液のために用いたのと同じ容量で）可溶化した。細胞デブリスを4°CでJA10ローターで9,000rpmで30分、ベレット状にする。上清に0.5% Empigen BBを補給し、30分、RTでインキュベートする。

【0126】

b) 精製

1) a. 固定化金属アフィニティーコロマトグラフィー

1.25mlのサンプルを、0.5% Empigen BB、6M塩化アミニン、50mM PO₄pH7.6で予め平衡化したZn²⁺-キレート化セファロ-

PBS pH7.2	560 μg/ml	81%
PBS pH7.0	498 μg/ml	72%
PBS pH6.8	327 μg/ml	48%

HPV18-Prot.D1/3-E7-Hisタンパク質は227アミノ酸から構成される。その理論分子量は25.9kDaである。それは還元SDS-PAGEで約31.5kDaに移動する。理論等電点は5.83である。

【0131】

実施例XV：融合Prot.D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→glu)型HPV18の作製

1) 発現プラスミドの作製

出発材料：

- 融合Prot.D1/3-E7-HisをコードするプラスミドpRIT14532(=TCA316)
- プラスミドLITMUS28(New England Biolabs cat no 306-28)、クローニングベクターpUC由来
- プラスミドpMG MCS Prot.D1/3(pRIT14589)、ヘモフィルスインフルエンセ株772、バイオタイプ2(H.Jansonら、1991、Infection and Immunity, Jan. p.119-125)の成熟プロテインDの残基Ser20→Thr127に対応するコドンによりインフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81が置換されている（上述の）pMG81の誘導体。Prot-D1/3の配列の後に、多重クローニング部位（11残基）及びC末端ヒスチジンテール(6His)のためのコーディング領域がある。

【0132】

pRIT14831(=TCA355)の作製：Hisテールを有する融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→glu)を発現するプラスミド

Hisテールが伸長したHPV18からのE7遺伝子のコーディング配列を有するpRIT14532(=TCA316)からのNcoI-XbaIフラグメントを変異のために有用な中間体ベクターLitmus28にサブクローン化し

SFFカラム(XK 26/20, Pharmacia; 50mlゲル/125ml可溶化)に充填する。カラムを塩化アミニン6M、PO4 50mM pH7.6によりベースラインに達するまで洗い、次に6M尿素、0.5M NaCl、50mM PO4 pH7.6で洗う。抗原を2ml/分で6M尿素、0.5M NaCl、50mM PO4 pH7.6中0.25Mイミダゾールにより溶出する（図1B）。IMACで溶出したサンプルを4°CでPBS pH7.4に対して透析する。

【0127】

1) b. Affi-Prep（登録商標）Polymyxin(Bio-Rad)

エンドトキシンレベルを減少させるために、28mg(37ml)の抗原を、PBS pH7.4で予め平衡化した2mlのAffi prep Polymyxin樹脂でバッチモードでインキュベートする。タンパク質回収は60%と評価されエンドトキシン含有量は6.5倍、減少する。

【0128】

1) c. 分析

還元SDS-PAGEで分析した精製した抗原は、クーマシブルー又は銀染色の後、主要30kDaバンド及び55kDaの第2のバンドを示す。非還元SDS-PAGEにおいてHPV-18-Prot.D1/3-E7-Hisは主に17.5kDa以上の分子量で主にスミアのように現れる。しかしながら、この酸化は、5mMのβ-メルカプトエタノールの添加により回収することができる。このパターンは、抗Prot.D1により又は抗Hisウエスタン・プロット分析により確認する。

【0129】

c) 安定性

精製した抗原は-20°C及び4°Cで一週間、安定である（分解なし）が、37°Cでのインキュベーション後より酸化しやすいようである。

d) 溶解度

タンパク質溶解度はpH依存性（以下を参照）でpH7.4で溶解度が減少する。

【0130】

PBS pH7.4	686 μg/ml	100%
-----------	-----------	------

てpRIT14910(=TCA348)を供する。E7/HPV16変異誘発との類似性により、網膜芽細胞遺伝子の癌抑制遺伝子産物(pR13)への結合を妨害するために二重変異cys27→gly及びglu29→gluを選択した。

【0133】

E7遺伝子中の変異の導入をキット"Quick Change Site directed Mutagenesis (Stratagene cat no 200518)"で実現した。pRIT14532はHPV18の原型配列におけるグリシンのかわりにE7の位置43におけるグルタミン酸の存在を示したので、位置43にグリシンを導入するために変異誘発の第2サイクルを行った。我々は、プラスミドpRIT14829(=TCA353)を得た。配列決定により完全なE7遺伝子の変異及び組込みの存在を確認した後、その変異したE7の遺伝子をベクターpRIT14589(=pMG MCS Prot.D1/3)に導入してプラスミドpRIT14831(=TCA355)を供した（図17を参照）。

【0134】

融合タンパク質-D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→glu)-Hisについての配列は図18に記載される。

2) Prot.D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→glu)-His/HPV18を発現する株B1098の作製

プラスミドpRIT14831を、λpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌AR58(Mottら、1985, Proc Natl Acad Sci. 82: 88)に導入し、カナマイシンに耐性である形質転換体についての選択により株B1098を供した。

【0135】

3) 細菌性B1098の増殖及び誘導-Prot.D1/3-E7変異(cys27→gly, glu29→glu)-His/HPV18

プラスミドpRIT14831で形質転換したAR58の細胞(B1098株)を50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で30°Cで増殖させた。増殖の対数期の間、細菌を39°Cにシフトしてレプレッサーを不活性

化し、Prot D1/3-E7変異-His/HPV18の合成に向かわせた。39°Cでのインキュベーションを4時間続けた。細胞をペレット状にし、-20°Cで保存した。

【0136】

4) 融合Prot D1/3-E7変異(cys24→glu, glu26→glu)-His型HPV16のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁した。細胞を20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amrescoで破壊する(3回)。その抽出物を16,000gで30分、4°Cで遠心する。

【0137】

SDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタンプロットでの分析

上の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。そのペレット画分にある約31kDaの主要バンドをクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギボリクローナル22J70抗プロテインDにより及びアクセスできるヒストジンテールを検出するモノクローナルPenta-His(Otagen cat no 34660)によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約3~5%を示す。

【0138】

実施例XVI：融合タンパク質D1/3-E6-his/HPV18の作製

1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589)はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81がヘモフィルス-インフルエンセ株772、バイオタイプ2(H Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan, p119-125)の成熟プロテインDの残基Ser20-Thr127に相当するコドンにより置換されている(上述の)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒストジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。このプラスミドを融合タンパク質D1/3-E6-Hisを発現させるのに用いる。

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amrescoで破壊する(3回)。その抽出液を4°Cで30分、16,000gで遠心する。上述の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・ブロッティングにより分析した。ペレット画分にある約32kDaの主要バンドをクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギボリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒストジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連続したN-i-NTAコンジュゲート(Otagen cat. no 34510)によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約3~5%を示す。

【0143】

実施例XVII：融合タンパク質-D1/3-E6E7-His(HPV18)を発現する大腸菌株の作製

1. 発現プラスミドの作製

a) プラスミドpMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589)はインフルエンザからのNS1コーディング領域のコドン4~81がヘモフィルス-インフルエンセ株772、バイオタイプ2(H Jansonら、1991, *Infection and Immunity*, Jan, p119-125)の成熟プロテインDの残基Ser20-Thr127に相当するコドンにより置換されている(上述の)pMG81の誘導体である。Prot-D1/3の配列の後に多重クローニング部位(11残基)及びC末端ヒストジンテールのためのコーディング領域(6His)がある。このプラスミドを融合タンパク質D1/3-E6E7-Hisを発現させるために用いる。

【0144】

b) HPVゲノムE6及びE7配列タイプHPV18(Coleら、J.Mol.Biol. 1987, 193, p.599~608)を、(Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelbergから得た)pBR322にクローニングしたHPV18全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローニングしてTCA302(=pRIT14467)を供した。

【0139】

HPVゲノムE6及びE7配列タイプHPV16(Coleら、J.Mol.Biol. 1987, 193, p.599~608)を、(Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum fuer human pathogen Papillomaviruses-D69120-Heidelbergから得た)pBR322にクローニングしたHPV18全長ゲノムから増幅し、pUC19にサブクローニングしてTCA302(=pRIT14467)を供した。

【0140】

プラスミドTCA314(=pRIT14526)の作製：融合タンパク質-D1/3-E6-His/HPV18を発現するプラスミド

E6のアミノ酸1~158に相当するスクレオチド配列をpRIT14467から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE6配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA314(=pRIT14526)を供した(図21を参照)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に変改が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D1/3-E6-His(HPV16)についての配列を図22に記載する。

【0141】

ARS5株の形質転換

プラスミドpRIT14526をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌ARS5(Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88)に導入した。

3. 細菌株の増殖及び誘導-Prot-D1/3-E6-Hisの発現

プラスミドpRIT14526を形質転換したARS5の細胞を、30°Cで50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を39°Cにシフトしてλレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6-Hisの合成に向かわせた。39°Cでのインキュベーションを4時間、続けた。細胞をペレット化し、-20°Cで保存した。

【0142】

4. 融合タンパク質D1/3-E6-Hisのキャラクタリゼーション

【0145】

c) TCA302(=pRIT14467)中のE6及びE7のためのコーディング配列を、E6及びE7遺伝子の間の11スクレオチドの欠失を導入し、E6の終止コドンを除去し、そしてプラスミドTCA320(=pRIT14618)中に融合したE6及びE7コーディング配列を作る(Hgal及びNsiI部位の間に挿入した)合成オリゴスクレオチドアダプターで変更した。図23を参照のこと。

【0146】

TCA328(=pRIT14567)の作製：融合タンパク質-D1/3-E6E7-His/HPV18を発現するプラスミド

融合E6E7タンパク質のアミノ酸1~263に相当するスクレオチド配列をpRIT14618から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、NcoI及びSpeI制限部位をE6E7融合配列の5'及び3'端に作り、プラスミドpMG MCS Prot D1/3の同じ部位への挿入を許容してプラスミドTCA328(=pRIT14567)を供した(図24を参照)。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に変改が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D1/3-E6E7-Hisについての配列を図25に記載する。

【0147】

2. ARS5株の形質転換

プラスミドpRIT14567をλpLプロモーターの熱感受性レプレッサーを含む欠失リソゲンを含む大腸菌ARS5(Mottら、1985, Proc.Natl.Acad.Sci., 82: 88)に導入した。

3. 細菌株の増殖及び誘導-Prot-D1/3-E6/E7-Hisの発現

プラスミドpRIT14512で形質転換したARS5の細胞を、30°Cで50μg/mlのカナマイシンを補給したLB培地100ml中で増殖させた。増殖の対数期の間、細胞を39°Cにシフトしてλレプレッサーを不活性化し、プロテインD1/3-E6E7-Hisの合成に向かわせた。39°Cでのインキュベーションを4時間、続けた。細胞をペレット化し、-20°Cで保存した。

【0148】

4. 融合タンパク質D1／3-E7-His (HPV16) のキャラクタリゼーション

凍結した細胞を解凍し、10mlのPBS緩衝液に再度懸濁する。細胞を、20,000psiでフレンチ圧力細胞プレスSLM Amincoで破壊する(3回)。その抽出液を4°Cで30分、16,000gで遠心する。

【0149】

上述の抽出物の遠心の後、上清及びペレットのアリコートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタン・プロッティングにより分析した。ペレット画分中にある約45kDaの主要バンドをクマシ染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗プロテインDにより、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシアルカリホスファターゼに連結したNi-NTAコンジュゲート(Oiagen cat. no 34510)によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約1%を示す。

【0150】

実施例XVIII：ワクチン製剤

ワクチンを、株AR58からの大腸菌中で発現された先の例からのタンパク質、並びにアジュバントとして、任意に油/水エマルション中、及び任意にコレステロールと調剤した、3de-O-アシル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)及び水酸化アルミニウム又は3D-MPL及び/又はQS21の混合物を含む製剤を調剤する。

【0151】

3D-MPLはグラム陽性細菌サルモネラ・ミネソタのリポポリサッカライド(LPS)の化学的に無毒化した形態である。Smith Kline Beecham Biologicalsで行った実験は、種々のビヒクルと組み合わせた3D-MPLが体液性及びTH1型の細胞免疫性の両方を増強する。

QS21は、強力なアジュバント活性を有するキラジャ・サボナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)樹木の樹皮の粗抽出物から精製された1つのサボニンであり：それは抗原特異的のリンパ球増殖及びいくつかの抗原に対するCTL

に希釈し、次にSB62、3D-MPL(5μg)、QS21(5μg)及び防腐剤として50μg/mlのチオメルサルを5分間隔で連続的に加える。エマルション容量は全容量の50%(100μlの投与量のために50μl)に等しい。全てのインキュベーションは攪拌しながら室温で行った。抗原を含まないアジュバントをタンパク質をPBSで置きかえることにより調製した。

【0156】

PROT D E7ワクチン抗原での腫瘍退化実験(HPV16)：融合タンパク質Prot D E7

プロテインDはグラム陰性細菌ヘモフィルスインフルエンザの表面に露出したリポプロテインである。融合パートナーとしてのプロテインDの109の最初の残基の封入物を組み込み、バイスタンダーヘルプ特性を有するワクチン抗原を供する。その抗原を前掲の通りQS21 3D-MPL及びSB62と共に調剤した。

【0157】

実験XIX：生体内腫瘍退化実験

腫瘍細胞系TC1：

C57BL/6マウスからの一次肺上皮細胞をHPV16E6及びE7により不死化し、次に活性化rasオンコジーンで形質転換してE6及びE7を発現する腫瘍細胞系を作った(Lin KYら、1996)。E7発現は、マウス抗HPV16 E7 Mab (Triton Corp. Alameda, CA) を用いて固定化浸透化TC1のFACS分析により確認されている。

【0158】

腫瘍成長：

試験管内増殖で増殖するTC1細胞をトリプシン処理し、無血清培地で2回、洗い、マウスの右側腹部にS.C.注入した。確立された腫瘍の治療を評価するために、TC1細胞を3×10⁴細胞/マウスの投与量で注入した。腫瘍注入後1及び2週に、PBS中もしくは3D-MPL、QS21及びSB62中の足内のprot D1/3 E7 His 100μl(50μl/足)中5μg又はPBSもしくはアジュバントのみでワクチン接種した。各々のグループに

Lの両方を活性化する。

【0152】

3D-MPL及びアルムを含む本発明の抗原を含むワクチンは、WO93/19780又は92/16231に記載されるものと同様に調製することができる。

Smith Kline Beecham Biologicalsで行った実験は、体液性及びTH1型細胞免疫応答の両方の誘導における3D-MPL及びQS21の組合せの明らかな共同効果を証明した。このような抗原を含むワクチンはUS5750110に記載される。

【0153】

油/水エマルションは2つの油(トコフェロール及びスクアレン)、及び乳化剤としてTween80を含むPBSから構成される。エマルションは、5%スクアレン、5%トコフェロール、0.4%Tween80を含み、180nmの平均粒径を有し、SB62として知られている(WO95/17220を参照のこと)。

【0154】

Smith Kline Beecham Biologicalsで行った実験は、このO/WエマルションのMPL/QS21への適用がそれらの免疫刺激特性を更に増加させることを証明した。

エマルションSB62(2倍濃縮物)の調製

Tween80をリン酸緩衝塩類溶液(PBS)に溶かしてPBS中2%溶液を供する。100mlの2倍濃縮エマルションを供するため、5gのDLαトコフェロール及び5mlのスクアレンをボルテキシングして全体を混合する。90mlのPBS/Tween溶液を加え、全体を混合する。次に生じたエマルションをシリングに通し、最後にM110Sマイクロフルーディクス機を用いることにより微小流体化する。生じた油滴は約180nmの大きさを有する。

【0155】

Prot D1/3 E7 QS21/3D MPL水中油製剤の調製

Prot D1/3-E7(5μg)を10倍濃度のPBS pH6.8及びH

5のC57BL/6マウス(Iffa Credo)を用いた。マウスを腫瘍成長について毎に2回、モニターした。平均腫瘍量/グループを図26に示す。PBS中prot D1/3 E7 Hisで又はPBSもしくはアジュバントのみでワクチン接種したマウスは次第に成長する腫瘍(0~1の無腫瘍動物/グループ)を発達させた。反対に、アジュバント中prot D1/3 E7 Hisをワクチン接種した5のマウスのうち4つが腫瘍を発展させず、1匹の動物が極めて小さくかつ安定な腫瘍を40日目に発達させた。この結果は、アジュバント中に調剤したHPV16からのタンパク質prot D1/3 E7 Hisがこの抗原を発現する小さな確立された腫瘍の退化を誘導することができることを示す。

【0159】

免疫学的読出し

増殖アッセイ：

試験管内アッセイのために、69日目に、ワクチン接種したマウスからの脾臓又は膝窩リンパ節を破壊することにより調製した。

2×10⁶の細胞のアリコートを、ラテックスマイクロビーズ(Sigma)に減少濃度(10, 1, 0.1μg/ml)のprot D1/3 E7 Hisをコートし、又はコートしない96ウェルプレート中で3回重複して入れて試験管内で細胞を再評価した(72Hrs)。T細胞増殖を3Hチミジン組込みにより測定した。

【0160】

図27及び28は、PBS、3D-MPL、QS21 SB62、Prot D1/3 E7 His及びProt D1/3 E7 His+3D-MPL、QS21、SB62このアジュバントにより生体内で用意した脾細胞及びリンパ筋細胞の増殖を刺激するprot D E7の能力を比較し、脾臓内の高い増殖性応答が、他のグループと比較してアジュバント中prot D1/3 E7 Hisで免疫化したマウスでのみ検出されたことを示す。

【0161】

抗体応答

個体の血漿をとり、同時に器官をとって、間接的ELISAにかけた。

5 μg/mlの精製したE7タンパク質をコート化抗原として用いた。37°Cで1時間のPBS+1%新生ウシ血清中の飽和の後、その血清を飽和緩衝液中で(1/100で始めて)連続的に希釈し、4°CでO/Nで、又は37°Cで90分、インキュベートした。PBS Tween 20中で洗った後、0.1%のビオチニル化ヤギ抗マウスIg(1/1000)又はヤギ抗マウスIgサブクラス(全部でIgG, IgG1, IgG2a, IgG2b)抗血清(1/5000)を第2抗体として用い、37°Cで90分のインキュベーションの後、ペルオキシダーゼに結合させたストレプトアビシンを加え、TMB(テトラメチルベンジン/ペルオキシド)を基質として用い、10分後、その反応をH₂SO₄ 0.5Mで停止させ、O.D. 450を測定した。

【0162】

異なるグループのマウスにおけるワクチン接種により誘発させたサブクラス特異的抗E7タイマーを、血清の相対的平均中点希釈の比較として図29に示す。

これらの結果は、Prot D1/3 E7 HPV16単独の2回の注入により弱い応答が誘発されることを示す。

アジュバントSB62, QS21+3D-MPLの存在下でProt D1/3 E7を注入した場合、かなり多い抗E7抗体が作られる。

【0163】

IgAもIgMも、アジュバントSB62, QS21+3D-MPL中のProt D1/3 E7を与えたマウスの血清でさえ、いずれの血清サンプルも検出されなかった。対照的に、全IgGレベルはProt D1/3 E7単独を与えたマウスのワクチン接種により少し増加し、アジュバントSB62, QS21+3D-MPLのタンパク質への添加により大きく増加した。異なるIgGサブクラスの濃度の分析は、抗原又はアジュバントのみを受容させたマウスの血清中で観察された濃度と比べて、アジュバント抗原を受容したマウスの血清において、分析したIgGサブクラスの全ての型(IgG1, IgG2a及びIgG2b)の濃度が増加するにつれ混合された抗体応答が説明されていることを示す。見い出された主要な異型は全てのIgGの80%超を示すIgG2bであり、この異型は一般に、TH1型免疫応答の誘導に関連しているといわれる。

図31及び32は、各々、脾細胞又は膝高リンパ節細胞の両方で、治療設定において観察されるように、SB62, QS21, 3D-MPLアジュバント中のE7タンパク質を与えたマウスについてより優れたリンパ球増殖活性が得られたことを示す。

抗体応答

図33は、治療設定と同様に、3D-MPL, QS210/Wアジュバント中に調剤したProt D1/3 E7タンパク質でワクチン接種したマウスの血清中でより優れた抗体応答が観察されたことを示す。この場合も、テストした全てのIgGサブクラス(IgG2a, IgG2b, IgG1)において混合された抗体応答が誘発され、IgG2bが全IgGの75%を示す主要な異型であることが見い出された。

【0169】

実施例XXI: Prot D1/3 E7 (HPV18)でのワクチン接種実験
マウスを、PBS又はQS21, 3D-MPL及びSB62, WO96/33739に記載されるDQ MPL又はWO98/15827に記載されるDQアルムMPL中の100μlのprot D1/3 18 E7 Hisイントラ・フット・パッド(50μl/フット・パッド)中5μgで2週間隔で2回、ワクチン接種した。8匹の6~8週齢Balb/cマウス(Iffa Credo)を各々のグループに用いた。14日後に、免疫学的の説出のために脾臓及びリンパ節をとり、血清学のために血液サンプリングを行った。

【0170】

○免疫学的説出:

増殖アッセイ:

試験管内アッセイのために、ワクチン接種したマウスからの脾臓又は膝高リンパ節を破壊することによりリンパ球を調製した。

2×10e5細胞のアリコートを、減少濃度(10, 1, 0.1, 0.01μg/ml)のprot D1/3 18 E7 Hisで96ウェルプレート内に3回重複して入れてその細胞を試験管内で再刺激した(72時間)。T細胞増殖を3Hチミジン組込みにより測定した。結果を、刺激インデックス(cpmサン

【0164】

実施例XX: 生体内腫瘍保護実験

マウスを、PBS、実施例1のアジュバント、5μgのprot D1/3 E7 His又は100μlの容量中フット・パット内の実施例1のアジュバント中の5μgのprot D1/3 E7 Hisのいずれかで14日間隔で2回、免疫化した。

【0165】

腫瘍成長:

最も新しいワクチン接種後4週間に、マウスを側腹部において2×10e5 TCC細胞/マウスS.C.で攻撃した。試験管内培養で増殖中のTCC細胞をトリプシン処理し、無血清培地で2回、洗い、注入した。各々のグループに用いた5匹のマウスを腫瘍成長について、1週間に2回、モニターした。

【0166】

図30は、SB62, QS21, 3D-MPLアジュバント中のE7タンパク質でのワクチン接種が、腫瘍の成長を進展させた、アジュバントなしのE7タンパク質又はアジュバントのみを受容させた他の全てのグループにおける腫瘍の発達に対してマウスを保護する(5匹のうち1匹だけの動物が極めて小さくかつ安定な腫瘍を有する)ことを示す。

【0167】

免疫学的説出:

最も新しいワクチン接種後3週に、腫瘍攻撃前に、各々のグループ内の5のマウスを免疫学的の説出のために殺した。

増殖アッセイ:

試験管内アッセイのために、リンパ球を脾臓から及び膝高排出性リンパ節から上述の通り調製した。2×10e5のアリコートを、ラテックスマイクロビーズ(Sigma)に減少濃度(10, 1, 0.1μg/ml)のprot D1/3 E7 Hisをコートした又はコートしない96ウェルプレート内に3回重複で入れた。

【0168】

ブル/cpmベースライン)として表す。

【0171】

図34及び35は、Prot D1/3 18 E7 His又はProt D1/3 18 E7 His+アジュバントのいずれかにより生体内でプライムした脾細胞又はリンパ節細胞の増殖を刺激するprot D1/3 18 E7の能力を比較し、タンパク質のみを与えたマウスにおいて基底リンパ球増殖が見られ、対照的にアジュバント中のprot D1/3 18 E7で免疫化したマウスにおいて脾臓において高い増殖応答が、リンパ節において極めて高い応答が検出された。

【0172】

サイトカイン生産

培地又はProt D1/3 18 E7(1又は3μg/ml)を伴う脾臓又はリンパ節の試験管内再刺激の96時間の期間の後、その培養上清中に生産されたサイトカイン(IL-5及びIFNγ)を、記載される通りELISAにより測定した:

IFNγ(Genzyme)

IFNγの定量をGenzymeからの試薬を用いてELISAにより行った。サンプル及び抗体溶液をウェル当り50μlで用いた。96ウェルマイクロタイヤプレート(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)を一晩、4°Cで、カーボネート緩衝液pH9.5中1.5μg/mlに希釈したハムスター抗マウスIFNγ 50μlで4°Cで一晩、コートした。次に、プレートを1時間、37°Cで、1%ウシ血清アルブミン及び1%Tween 20(飽和溶液)を含むPBS 100μlとインキュベートした。飽和緩衝液中の試験管内刺激(1/2で開始)からの上清の2倍希釈物を抗IFNγコート化プレートに加え、1時間30分、37°Cでインキュベートした。そのプレートをPBS Tween 0.1% (洗浄液)で4回、洗い、最終濃度0.5μg/mlに飽和緩衝液で希釈したビオチンコンjugate化ヤギ抗マウスIFNγを各々のウェルに加え、37°Cで1時間、インキュベートした。洗浄ステップの後、飽和緩衝液に1/10000で希釈したAMDEXコンjugate(Amersham)を37°Cで30分、加えた。

プレートを上述の通り洗い、15分、50μlのTMB (Biorad) とインキュベートした。その反応をH₂SO₄ 0.4Nで停止させ、450nmを読んだ。Softmax Pro (4パラメータ等式) により標準曲線 (マウスIFNγ標準) を用いて濃度を計算しpg/mlで表した。

【0173】

IL-5 (Pharmingen)

IL-5の定量を、Pharmingenからの試薬を用いてELISAにより行った。サンプル及び抗体溶液をウェル当たり50μlで用いた。96ウェルマイクロタイプレート (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark) を一晩、4℃で、カーボネート緩衝液pH9.5に1μg/mlに希釈した50μlのラット抗マウスIL-5でコートした。次にプレートを1時間、37℃で、1%ウシ血清アルブミン及び0.1%Tween 20を含む100μl PBS (飽和緩衝液) とインキュベートした。飽和緩衝液中の試験管内刺激 (1/2で開始) からの上清の2倍希釈物を抗IFNγ-コート化プレートに加え、1時間30分、37℃でインキュベートした。そのプレートをPBS Tween 0.1% (洗浄液) で4回、洗い、最終濃度1μg/mlで飽和緩衝液で希釈したビオチンコンジュゲート化ラット抗マウスIL-5を各々のウェルに加え、37℃で1時間、インキュベートした。洗浄ステップの後、飽和緩衝液中1/10000に希釈したAMDEXコンジュゲート (Amersham) を30分、37℃で加えた。上述の通りプレートを洗い、15分、50μlのTMB (Biorad)と共にインキュベートした。その反応をH₂SO₄ 0.4Nで停止させ、450nmを読んだ。Softmax Pro (4パラメータ等式) により標準曲線 (粗換算マウスIL-5) を用いて濃度を計算し、pg/mlで表した。

【0174】

脾臓細胞で始めて、テストしたグループ全てでIL-5は検出できず、対照的に、全てのグループにおいて極めて高い生産量のIFNγ生産が観察され、他のグループと比べて、SBAS1cで補助したタンパク質を与えたマウスのグループにおいて少しだけ増加した。このことは、TH1型の免疫応答の誘導を示唆する。

gG1、4.8% IgG2a及び4.3% IgG1、4.4% IgG2a。最も強力な抗体応答は、アイソタイプ濃度の明確なシフトを伴うDQアフルムで調製したタンパク質で得られる。Balb/cマウスにおけるIgG2aアイソタイプは一般に、TH1型の免疫応答の誘導に関連していると考えられるので、これらの結果はDOS21、3D-MPL及びSB62 QS21/3D-MPLアジュバントが体液性応答のTH1型プロファイルを増加させる傾向があり、SBS5は明らかなTH2型の応答を誘導することを示唆する。

【0178】

図38は、血清の中点希釈、及び異なるグループにおけるワクチン接種により誘発される異なるアイソタイプの相対的割合の比較を示す。

結論：

我々は、融合タンパク質：1/3 Prot D及びHPV16の早期タンパク質E7が潜在的な全身的抗腫瘍免疫性を誘導することを証明し、融合タンパク質：Prot D1/3及びHPV18のE7もマウスにおいて免疫原性を示している。Prot D1/3 E7 HPV16融合タンパク質でのワクチン接種は、E7発現性腫瘍細胞での腫瘍攻撃からマウスを保護し、ワクチン接種部位から離れた部位に注入したHPV16のE7を発見する小さな予め確立された腫瘍を排除した。

【0179】

我々は、アジュバント中のProt D1/3 E7 HPV16タンパク質がヘルパーT細胞増殖を増強することができる事を証明し、このことは、このワクチンにより誘導される抗腫瘍免疫応答がCD4+T細胞応答と少くとも部分的に関連していることを示唆する。

我々は、3D-MPL含有アジュバントの存在下でのProt D1/3 E7でのワクチン接種により優れた抗体応答が誘発されることを証明した。C57BL/6マウス中に見い出された主要アイソタイプIgG2bはTH1型免疫応答がおこったことを示唆する。

【0175】

リンパ節細胞に関して、タンパク質のみを与えたマウスのグループにおいて極めて弱いIFNγ生産が観察され、アジュバントをかえたタンパク質で5~10倍の増加が観察される。IL-5は、SBAS2アジュバント添加タンパク質を与えたマウスのグループにおいてのみIL-5を検出することができた。

図36及び37は、各々脾臓又はリンパ節細胞の試験管内再刺激後のサイトカイン (IFNγ及びIL-5) の生産を刺激するProt D1/3 18 E7 Hisの能力を比較する。

【0176】

抗体応答

個々の血清を器官と同時に採取し、間接的ELISAにかけた。

2. 5μg/mlの精製したprot D1/3 18 E7タンパク質HPV18をコートされた抗原として用いた。37℃で1時間、PBS+1%新生ウシ血清中に飽和した後、その血清を飽和緩衝液で(1/100で始めて)連続的に希釈し、O/Nで4℃で90分、37℃でインキュベートした。PBS Tween 20で洗った後、ビオチニル化ヤギ抗マウスIg (1/1000) 又はヤギ抗マウスIgサブクラス (全部でIgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) 抗血清 (1/5000) を二次抗体として用い、37℃で90分のインキュベーションの後、ペルオキシダーゼに結合したストレプトアビジンを加え、TMB (テトラメチルベンジン/ペルオキシド) を基質として用い、10分後、その反応をH₂SO₄ 0.5Mで停止させ、O.D. 450を測定した。

【0177】

Prot D1/3 18 E7単独の2回の注入で極めて弱い抗体応答が誘発される。全体のIgGレベルはアジュバントをタンパク質ワクチンに加えることにより大きく増加した。

異なるIgGサブクラスの濃度の分析は、アジュバント、DOS21、3D-MPL又はSB62、QS21/3D-MPLの存在下でタンパク質を注入した時、IgG2aサブタイプの割合が少し増加したことを見出す: 非アジュバント添加タンパク質でIgG1 4.6%、IgG2a 3.2%と比べて各々2.8%。

【図1】

Figure 1
融合タンパク質Prot D1/3-E7-Hisの配列
 1 MDPSSHSSNN ANTMQKSDKIIAHRGASGY LPEHTLESKA LAFAQQADYL
 5 51 EQDLAMTKDG RLVVIHDHFL DQLTDVAKKF PHRHRKDGRY YVIDFTLKEI
 10 101 QSLLEMNTFE TMAMHGDTPT LHEYMLDLQP ETIDLYCYEQ LNDSEEEDDE
 15 151 IDGPAGQAEF DRAHYNIVTF CCKCDCSTLRL CVQSTHVDIR TLEDLLMGTI
 20 201 GIVCPICSOK PTSGHIIHHHHH*

Figure 1b
融合タンパク質Prot D1/3-E7-Hisの配列
 1 ATGGATCCAA CGACGGCATTC ATCAAATATG OCGAATAACCC AAATGAAATC
 5 51 AGACAAAATC ATTATTCGTC ACCCGTTGTC TAGCGGTTAT
 TTACCAAGAC
 10 101 ATACGTTAGA ATCTAAAGCA CTGGCGTTTG CACAACAGGC
 TGATTATTTA
 15 151 GAGGAAGAGTT TAGCAATGAC TAAGGAATGGT GTGTTAGTGG
 TTATTCAAGA
 20 201 TCACITTTA GATGGCTTGA CTGATGTTGC GAAAAAAATTC
 CCACATCGTC
 25 251 ATCGTAAAGA TGGCCGTTAC TATGTCATCG ACTTTACCTT
 30 301 AAAAGAAAAT
 35 351 CAAAGTTAG AAATGACAGA AAACCTTTGAA ACCATGGCCA
 TGCATGGAGA
 40 401 TACACCTACA TTGCAATGAAT ATATGTTAGA TTTGCAACCA
 GAGACAACCTG
 45 451 ATCTACTG TTATGACAA TTAATGACA OCTCAGAGGA
 GGAGGATGAA
 50 501 ATAGATGGTC CAGCTGGACA AGCAGAACCG GACAGAGGCC
 ATTACAAAT
 55 551 TGTAACCTTT TGTGCAAGT GTGACTCTAC GCTTCGGTTC TGCGTACAAA
 60 601 GCACACACGT AGACATTCTGT ACTTTGGAAG ACCTGTTAAT
 GGGCACACTA
 65 651 GGAATTGTGT GCCCCATCTG TTCTCAGAAA CCAACTAGTG

【図1-1】

GCCACCATCA
 651 CCATCACCATTA

Figure 1

【図2】

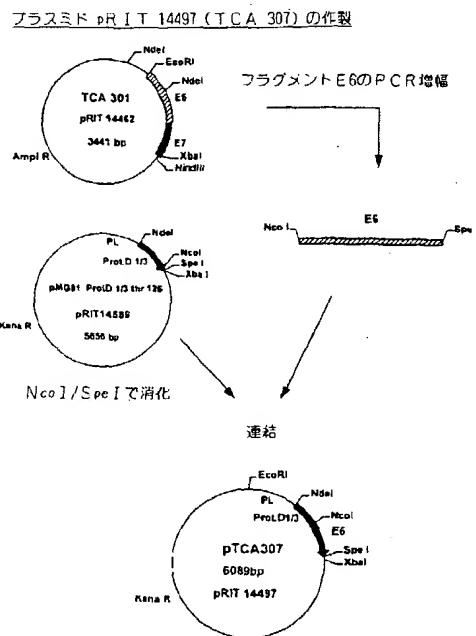


Figure 2

【図3】

PROT-D1/3 E6 His/HPV16の配列

ヌクレオチド配列

```

ATGGATCAAAGCAGGCCATTCAAAATGCGGAATACCCAAATGAAATC 10
5 AGACAAAATCTTATTGCTCACCGTGTGCTAGCGTTATTACAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCATTGCGTTTGCAACACAGCGTATTATA 150
GAGCAAGATTAGCAATGACTAAAGGATGGCTTACTGTTGCAAA 200
TCACTTTTAGGCTTACTGATGTTGCGAAAAATTCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCGTIACTATGTCATCGACTTACCTAAAAAGAAATT 300
10 CAAAGTTAGAATGACAGAAAATTTGAAACCATGCGATGTTTACAGGA 350
CCCACAGGACGCCAGAAAATGTTACACAGTATGCAACAGCTGC 400
CAACTATACATGATAATATATAGAATUTGCTACTGCAAGCAACAGTTA 450
CYGCACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTCGGGATTATGCTAGTATA 500
TAGAGATGGAAATCCATATGCTATGTGATAAAATGTTAAAGTTTAATT 550
15 CTAAAATTAGTGTAGATAGACATTATGTTATAGTTGATGGAACACA 600
TTAGAACGAAATACACAAACCGTGTGATTGTTAAATTAGGTGTAT 650
TAACGTGCAAAAGCCACTGTCCTGAGAAAAGCAAGACATCGACA 700
AAAAGCAAAAGTCCATAATATAAGGTCGGTGGACCGGTGGATATGTC 750
TCTTGTGAGACATCAAGAACACGAGAGAAACCAGCTGACTAGTGG 800
20 CCACCATCACCATCACCATTA 822

```

ペプチド配列

```

MDPSSHSSNMANTOMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALFAQQADYL 50
EQDLAMTKDGLRLVVIHDHFQDGLTDVAKKPPDURKRDGRYYVVIDFTLKEI 100
QSLEMNTENFETMAMFQDPQERPRKLPLQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL 150
25 LRREVYDFAFRDLCIVYRDNPYAVCDKCLKFYSKJSEYRHYCVSLYGT 200
LEQQYNKPLCDLIRKJCNCQKPLCPPEKORJLDKQRFHNRGRWTGRCM 250
SCCRSSRTRRETQLTSQHHHHHHH. 274

```

Figure 3

【図4】

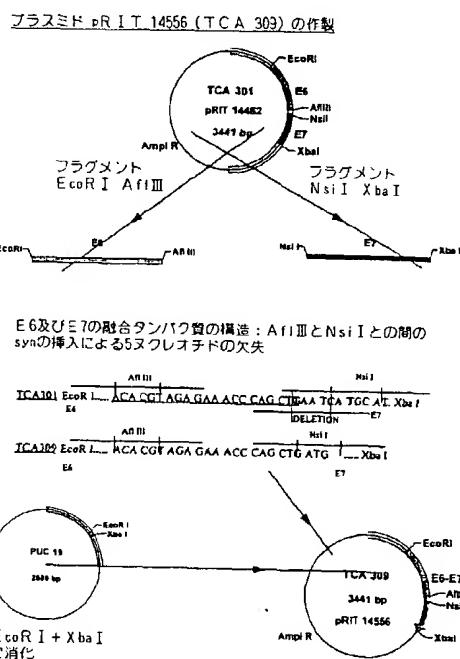


Figure 4

【図5】

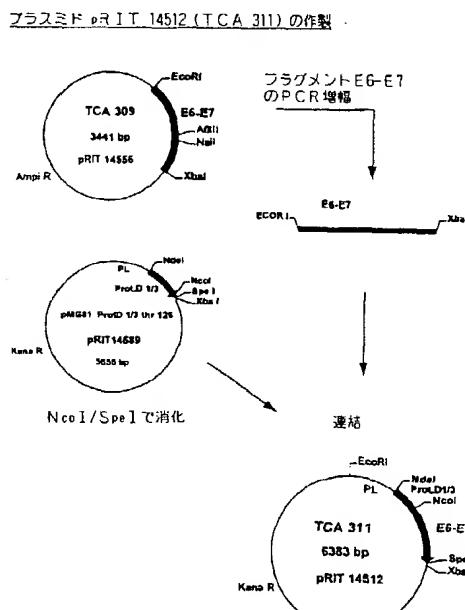


Figure 5

[図6]

PROT-D1/3-E6-E7-His/HPV16の配列

ペプチド配列:

```

ATGGATCCAAAGCAGCCATTCAAAATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATGCTCACCGTGGCTAGGGTTATTCACAGAC 100
5 ATACGTTAGAACTAAAGCACTGGCTTGACACACAGCGCTGATTATT 150
GAGCAAGATTAGCAATGACTAACGGATGCTGTTAGTGTATTCACGA 200
TCACITTTAGATGCTGTTAGCTGATGTTGGAAAAAAATCCCACATCGTC 250
ATCGIAAAGATGCGCTTACTATGTCATCGACTTACCTTAAAGAAATT 300
CAAAGTTAGAAATGACAGAAAATCTTGAACCATGCCATGTTTCAGGA 350
10 CCCACAGGAGCCAGCAAGAAGTACACAGTATGACAGAACGAAATC 400
CAACTATACATGATAATAATTAGAAATGTTGACTGCAAGCAACAGTT 450
CTGGGACTGTGAGYATATGACTTTGCTGGATTATGCATGATA 500
TAGAGATGGAAATCCATATGCTGTATGTTGATAAAATGTTAAAGTT 550
CTAAAAATTAGTGAATAGACATTATGTTGATAATGTTGAAACAACA 600
15 TTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTTGATTTGTTAATAGGTGTAT 650
TAATGTCAAAAGCCACTGTCTGAAGAAAACCAACATGAGACA 700
AAAAGCAAAADATCCATAATAAAGGGTCTGGTGGACCGGTGATGATGAT 750
TCTTGTGAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCGCTGATGATGATG 800
AGATACACCTATGCTGATGATAATGTTGATGTTGAAACAGAGACAA 850
20 CTGATCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTGAGAGGAGGAT 900
GAAATAGATGGCCAGCTGGCAACAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAA 950
TATIGTAACCTTTGTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGCGTAC 1000
AAAGCACACAGCAGACATTCTGATCTGGAAAGACCTGTTAATGGCACA 1050
CTAGGAATTGTTGCCCCATCTGTTCTGAAACCAACTAGTGGCCACCA 1100
25 TCACCATCACCATTAA 1116

```

ペプチド配列:

```

MDPSSHSSNMANTQMSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 30
EQDLAMTKDGRLVVHDHFIDGLTDVAKKFPHRKRDGRYYVIDFTLKEI 100
30 QSLEMTENFETMAMFQDPQEPRKLQLPQLCTELOTTIHDIILECVYVCKQQL 150
LRREVYDFAFRDLCIVYRDNQPYAVCDKCLKPFYSKUSEVRHYCYSLYGIT 200
LEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLKKQRFHNRGRWTGRCM 250
SCCRSSRTRRETQLMHGDTPTLHEYMLDLOPETTDLYCYEQLNDSSEED 300
EIDGPAGQAEPDRAHYNIIVTFCCCKDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGT 350
35 LGIVCPICSOOKPTSGHHHHHHH. 372

```

Figure 6

[図7]

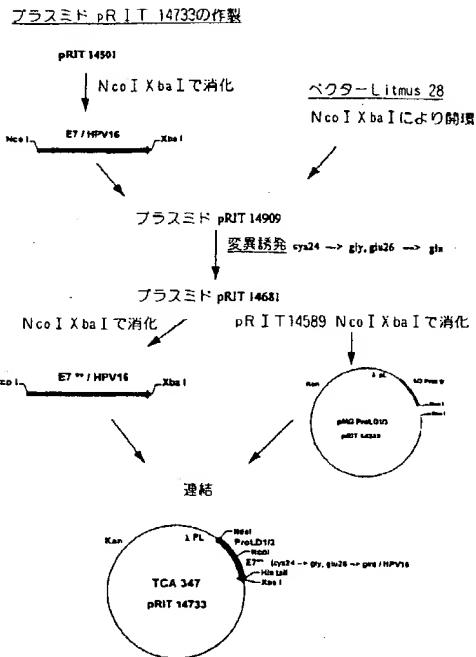


Figure 7

[図8]

PROT-D1/3-E7 変異 (cys24→gly, glu26→glu) HPV16の配列

スクリオチド配列:

```

ATGGATCCAAAGCAGCCATTCAAAATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATGCTCACCGTGGCTAGGGTTATTCACAGAC 100
5 ATACGTTAGAACTAAAGCACTGGCTTGACACACAGCGCTGATTATT 150
GAGCAAGATTAGCAATGACTAACGGATGCTGTTAGTGTATTCACGA 200
TCACITTTAGATGCTGTTAGCTGATGTTGGAAAAAAATCCCACATCGTC 250
ATCGIAAAGATGCGCTTACTATGTCATCGACTTACCTTAAAGAAATT 300
CAAAGTTAGAAATGACAGAAAATCTTGAACCATGCCATGTTTCAGGA 350
10 CCCACAGGAGCCAGCAAGAAGTACACAGTATGACAGAACGAAATC 400
CAACTATACATGATAATAATTAGAAATGTTGACTGCAAGCAACAGTT 450
CTGGGACTGTGAGYATATGACTTTGCTGGATTATGCATGATA 500
TAGAGATGGAAATCCATATGCTGTATGTTGATAAAATGTTAAAGTT 550
CTAAAAATTAGTGAATAGACATTATGTTGATAATGTTGAAACAACA 600
15 TTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTTGATTTGTTAATAGGTGTAT 650
TAATGTCAAAAGCCACTGTCTGAAGAAAACCAACATGAGACA 700
AAAAGCAAAADATCCATAATAAAGGGTCTGGTGGACCGGTGATGATGAT 750
TCTTGTGAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCGCTGATGATGATG 800
AGATACACCTATGCTGATGATAATGTTGATGTTGAAACAGAGACAA 850
20 CTGATCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTGAGAGGAGGAT 900
GAAATAGATGGCCAGCTGGCAACAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAA 950
TATIGTAACCTTTGTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGCGTAC 1000
AAAGCACACAGCAGACATTCTGATCTGGAAAGACCTGTTAATGGCACA 1050
CTAGGAATTGTTGCCCCATCTGTTCTGAAACCAACTAGTGGCCACATCA 1100
25 CCATCACCACTTAA 663

```

変異: T409 → G
G415 → C

ペプチド配列:

```

MDPSSHSSNMANTQMSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 30
EQDLAMTKDGRLVVHDHFIDGLTDVAKKFPHRKRDGRYYVIDFTLKEI 100
30 QSLEMTENFETMAMFQDPQEPRKLQLPQLCTELOTTIHDIILECVYVCKQQL 150
LRREVYDFAFRDLCIVYRDNQPYAVCDKCLKPFYSKUSEVRHYCYSLYGIT 200
LEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLKKQRFHNRGRWTGRCM 250
SCCRSSRTRRETQLMHGDTPTLHEYMLDLOPETTDLYCYEQLNDSSEED 300
EIDGPAGQAEPDRAHYNIIVTFCCCKDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGT 350
35 LGIVCPICSOOKPTSGHHHHHHH. 221

```

変異したアミノ酸: cys24→gly (= C24→G), glu26→glu (= E26→Q) of E7は融合タンパク質の残基137及び139である

N term M D P-ProD1/3(aa4 → 111)-M A-mutated E7(aa 114 → 211)-TSGHHHHHH Cterm.

Figure 8

[図9]

プラスマド pRIT 14634 (TCA 332) の作製

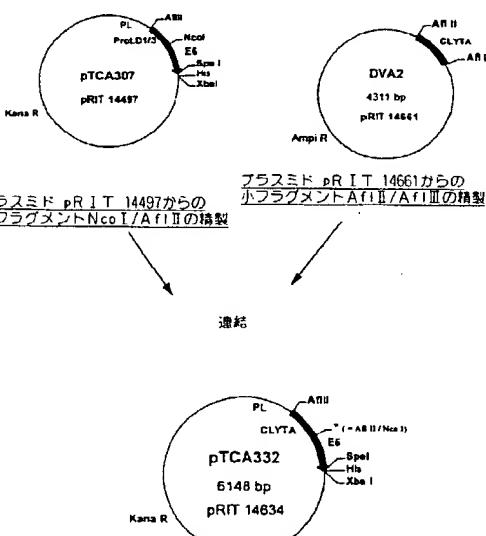


Figure 9

[図10]

C L Y T A - E 6 - H i s の配列

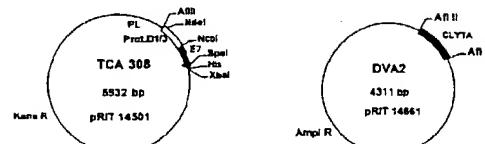
ヌクレオチド配列

5 ATGAAAGGGGAATTGTACATTCAGACGGCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
TGAGAAAATCAATGGCACTTGTACTACTTGTACAGTTCAGGCTATATGC 100
TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGCGCAACTGGTACTGGTTCGAC 150
AACTCAGGCAAATGGCTGGAGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTA 200
CTATTCACAGAAGAGGTGCGATGAGACAGCGCTGGTCAGTACAAGG 250
10 ACACTTGTACTACTTAGCGCTAAAGAAGGCCCATGGTATCAATGCC 300
TTTATCCAGTCAGCGACGGCAACAGCGCTGGTACTACCTCAAAACAGCGG 350
AACACTGGCAGACAGGCCAGATTGGCACATGCTGGACATGCCATG 400
TTCAGGAGACAGGGGCCAGAGGGTACACAGGTTACAGCTCACAGAG 450
CTGCAAACAACTATACATGATAATAATTAGAATGTGTACTGCAAGCA 500
15 ACAGTTACTCGACGTGGAGTATAGTACTTGTCTGGGATTATGCA 550
TAGTATATAGAGATGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAAATGTTAAAG 600
TTTTATCTAAAAATTAGTGTAGTATAGACATTTTATATAGTTGTATGG 650
AACACATTAAGACAGCAATCAACAAACCGTGTGTGATTGTTAAATT 700
GGTGTATAACTGTCAAAAGCCACTGTGCTCTGAAGAAAAGCAAGACAT 750
20 CTGGACAAAAGCAGATTCAATAATAAGGGGTCGGTGGACCGGTCG 800
ATCTATGCTTGTGAGATCATCAAGAACACGAGAGAAACCCAGCTGA 850
CTAGTGGCACCATCACCATCACATTAA 879
ペプチド配列
25 MKGGIVHSDGSYPKDKFEKJNTWYFYDSSGYMLADRWRKHTDGWYWFD 50
NSGEMATGWKKJADKWYYFNEEGAMKTGWWVYKDWTWYLDKEGAMVSNA 100
FIQSADGTGWWYLKPDGTLADRPESLMDMAMFQDPQERPRKLPLCLCE 150
LQTTIHDIILECVYCKOQLLRREVYDFAFRDLCLIVYRDGNPYAVCDKCLK 200
FYSKISEVRHYCYSLYGTTEQOYNKPLCDLLIRCNQKPLCPPEEKQRH 250
30 LDKKQRFHNRGRWTGRCMSCCRSSKTRETOLTSGHHHHHHH. 293

Figure 10.

[図11]

プラスミド pRIT 14626 (TCA330) の作製

プラスミド pRIT 14501からの
大フラグメント NcoI/AflI の精製プラスミド pRIT 14661からの
小フラグメント AflII/AflIII の精製

連結

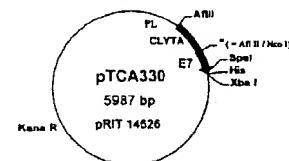


Figure 11

[図12]

C L Y T A - E 7 - H i s の配列

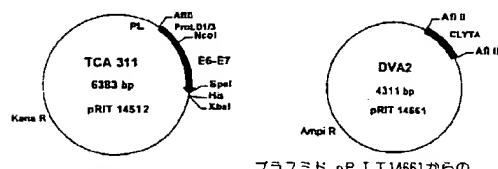
ヌクレオチド配列

5 ATGAAAGGGGAATTGTACATTCAGACGGCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
TGAGAAAATCAATGGCACTTGTACTACTTGTACAGTTCAGGCTATATGC 100
TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGCGCAACTGGTACTGGTTCGAC 150
AACTCAGGCAAATGGCTGGAGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTA 200
CTATTCACAGAAGAGGTGCGATGAGACAGCGCTGGTCAGTACAAGG 250
10 ACACTTGTACTACTTAGCGCTAAAGAAGGCCCATGGTATCAATGCC 300
TTTATCCAGTCAGCGACGGCAACAGCGCTGGTACTACCTCAAAACAGCGG 350
AACACTGGCAGACAGGCCAGATTGGCACATGCTGGACATGCCATG 400
ATGGAGATAACCTCATGCTGATAATATGTTAGTGTAGGACAGAG 450
ACAACTGATCTACTTTATGAGCAATTAAATGAGCTCAGAGGGAGA 500
GGATGAAATAGATGGTCCAGGCTGGACAGCAACCGGAGAGGCCATT 550
15 ACATATTGTAACCTTGTGCAAGTGTGACTCTACGGCTTCGGTGTG 600
GTACAAAAGCACACCGTAGACATTCGACATTGGAAGACCTGTTAATGG 650
CACACTAGGAATTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAAACCAACTGTGCC 700
ACCATCACCATCACATTAA 720
ペプチド配列
20 MKGGIVHSDGSYPKDKFEKJNTWYFYDSSGYMLADRWRKHTDGWYWFD 50
NSGEMATGWKKJADKWYYFNEEGAMKTGWWVYKDWTWYLDKEGAMVSNA 100
FIQSADGTGWWYLKPDGTLADRPESLMDMAMFQDPQERPRKLPLCLCE 150
TTDLYCYEQLNDSSEEDEIDGPAGQAEPDKAHYNIVTFCCCKCDSTRLRC 200
VQSTHVDIRTLEDLLMGTGLIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 240
25

Figure 12

[図13]

プラスミド pRIT 14634 (TCA331) の作製

プラスミド pRIT 14512からの
フラグメント NcoI/AflII の精製プラスミド pRIT 14661からの
小フラグメント AflII/AflIII の精製

連結

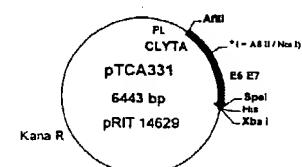


Figure 13

【図14】

CLYTA-E6E7-His.の配列

スクレオチド配列

```

ATGAAAGGGGAATTGTACATTAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
TGAGAAAATCATGGCACTTGGTACTACTTGCAGGTCAGGCTATATGC 100
TTCCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCACTGGTACTGGTCGC 150
AACTCAGGGAAATGGCTACAGGGCTGGAGAAAATGGCTGATAAGTGT 200
CTATTCACAGAAGAAGGTGGCAGAGACAGGGCTGGGTCAAGTACAAGG 250
ACACTTGGTACTACTTACAGCCTAAAGAAGGCCATGGTATCAAATGCC 300
TTTATCCAGTCAGCGGACGGACAGGGTGTACTACCTCAACCAGACGG 350
AACACTGGCAGACAGGCCAGAAATGGCCAGCATGGACATGGCCATGT 400
TTCAGGACCCACAGGGCGACCCAGAAAGTACACAGTTATGGCAGAG 450
CTGCAAAACAATACATGATATAATTAGAATGTGTACTGGCAAGCA 500
ACAGTTACTGGCAGCTGGAGGTTATGACTTTGCTTTCGGGTTATGGCA 550
TAGTATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAATGTTAAAG 600
TTTATCTAAAATTAGTGATATAGACATTATGTTATGTTGTATGG 650
AACAAACATTAGAACGAACTAACAAACCCGTTGTTGATTGTTAAG 700
GGTGTATTAACTGTCAAAAGCCACTGTGCTCTGAAGAAAAGCAAGACAT 750
CTGGACAAAAAGCAAGATTCATATAAAAGGGTCGTTGGACCGCTGG 800
ATGATGTCITGTTGAGATCATCAAAAGAACCTGAGAGAAACCCAGCTGA 850
TGCATGAGGATACACCTACATGGCATGATAATATGTTAGATTGCAACCA 900
GAGACAACCTGATCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGA 950
GGAGGATGAAATAGATGGCTGAGCTGGACAAGCAGAACCCGAGAGCCC 1000
ATTACAATATTGAACTCTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTG 1050
TGGGTACAAAGCACACAGTAGACATTCGACTTTGGAGACCTGTTAAT 1100
GGGCACACTAGGAATTGTGCCCCATCTGTCAGAAACCAACTAGTG 1150
GCCACCATCACCATCACCTAA 1173
ペプチド配列
MKGGIVHSDGSYPDKFEKINGTWYVFDSSGYNLADRWRKHTDGNWYWD 50
NSGEMATGWKKJADKWWYFNEEGAMKTGVVKYKDWTWYLDAKEGAMVSNA 100
FIQSADGTGWWYLPDGLADRPELASMIDMAMFQDPQERPRKLPLCTE 150
LQTTHDILECVCKQQLLRKEVYDFAFRDLCLIVYRDGNPYAVCDKCLK 200
FYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQYQYNPKLCDLIICINCQKPLCPPEEKQRH 250

```

【図14-1】

```

LDICKQRFHNIIGRWTGRCMSSCRSSRTRRETLQMLHGDPTPLHEVMDLQP 300
ETTDLVYCEQLDSSSEEDBDGPGAGAEPRDHAYNIVTFCCCKCDSTLRL 350
CVQSTHVDIKTLEDILMGTLGIVCPICSQKPTSGHHHHHHH. 391

```

Figure 14

【図16】

PROT.D1/3-E7-HIS/HPV18の配列

スクレオチド配列

```

ATGGATCCAAGCAGCCATTATCAAAATGGCAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATATTGTCACCCCTGCTCTAGCGGTTATTCACAGAGC 100
ATACGTTGAATCTAAAGCACTTGCCTGTTGACAAACAGGCTGATTATTA 150
GAGCAAGTTAGCAATGACTAAGGATGTTGTTGTTGTTTACAGCA 200
TCACTTTATAGTGGCTGACTGATGTTGGCAAAAAATCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAGAATT 300
CAAACCTTGAATGACAAAAACCTTGAACACATGCCATCGTGGACC 350
TAAGGCAACATTGCAAGACATTGATGCAATITAGAGCCCCAAATGAAA 400
TCCGGTTGACCTCTATGTCACGGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450
AACATGAAATAGTGAATTAATCATCAACATTACAGGCCAGAGGC 500
CGAACACCAACGTACACATGTTGTTGTTGTAAGTGTGAAGGCC 550
GAATTGACTTAGTAGAAGACTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAG 600
CAGCTTTCTGAACACCCCTGCTTGTGTCGTTGTCGTTGTCATCCC 650
GCAGACTAGTGGCACCATCACCATCACCATTAA 684
ペプチド配列
MDPSSHNNMANQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKA 40
LAFAQQADYLEQDLMATKDGRVVJHDHFLDGLTDVAKKF 80
PHRHDKDRYYVDFTLKEIQSLEMENFETMAHGPKAT 120
LQDIVLHLEPQEIPV DLLCHEQLSDSEEENDEIDEVNHQ 160
HLPARRAEPQRHTMLCMCCCKCEARIELVVESSADDLRAFQ 200
QLFLNTLSFVCPCASQQTSGHHHHHHH. 228

```

Figure 16

【図15】

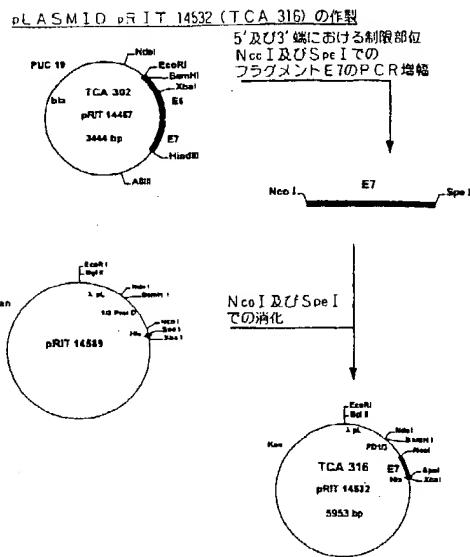


Figure 15

【図17】

プラスミド pRIT 14523 (TCA 313) の作製

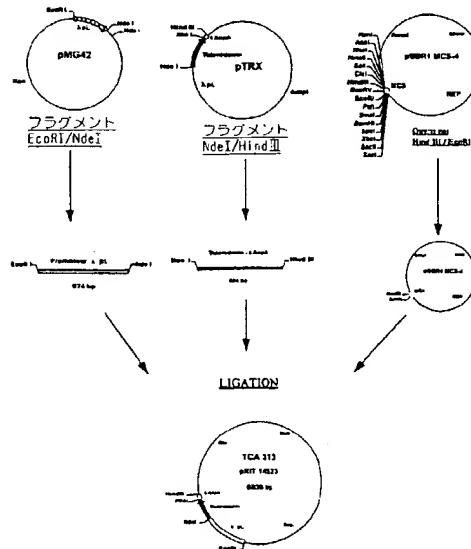


Figure 17

[図18]

チオレドキシンの配列

5
MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCPCCKMIA 40
PILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPFTAQPKYGIIGIPTLL 80
LFKNGEVAATKVGAISKGQLKEFLDANLA. 110

10

Figure 18

チオレドキシンの配列

[図19]

プラスミド pRIT 14801 の作製

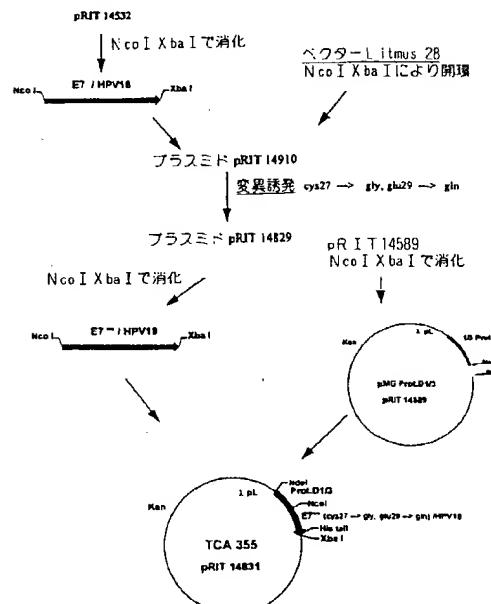


Figure 19

[図20]

PRO.T.D1-3-E7変異(cys27→gly, glu29→gln) HPV18の配列

ヌクレオチド配列:
ATGGATCCAAGCAGCCATTACATCAAATATGGCGAAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCTATTGCTCACCGTGGTOCTAGCGGTATTTACCGAGC 100
ATACGTTGAATCTAAAGCATTGCGTTGACAACAGGCTGATTATTAA 150
GAGCAAGATTAGCAATGACTAAAGGATGGCTGTTAGTGGTTATTCACGA 200
TCACCTTITAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCCCTTACTATGTCATCTGACTTTACCTTAAAGAAAT 300
10 CAAAGTTAGAAAATGACAGAAAATCTGAAACCATGGCATGCATGGACC 350
TAAGGCAACATTGCAAGACATGTTGCACTTAAAGGCCCAAAATGAAA 400
TTCCGGTTGACCTCTAGGTACCCAGCAATTAAAGGGACTCAGGGAGA 450
AACGATGAAAATAGTGGAGTTAATCATCACACATTACAGCCGACGAGC 500
CGAACCCAAACCGCACACAACTGTTGTATGTGTTAAAGTGTGAAGCCA 550
15 GAATTGAGCTAGTAGTAGAAAGCTCAACAGACAGACCTTCAGACATCCAG 600
CAGCTTTCTGAAACCCCTGCTCTTGTGTCGTTGCTGATCCCCA 650
GCAGACTAGTGGCACCATACCACTACACATTAA 684
変異: T418 → G
G424 → C

20 ペプチド配列:
MDPSSHSSNMANOMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 50
EQDLMTKDGRLVVHDFLGLTDVKKFPHRHDKGRYYVIDFTLKEI 100
QSLEMTEFETMAMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPV DLLGHQQLSDSEEE 150
NDEIDGVNHQHPARRAEPORHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFO 200
25 QLFLNTLSFVCPWCAQQTSGHHBDDH. 228
変異したアミノ酸:cys27→gly(=C27→G), glu29→gln(=E29→Q) of E7
は結合タンパク質の残基140及び142である。
N term MDP-ProD10(aa4 → 111)-M A-mutated E7(aa 114 → 218)-TSGHHHHHH
Cterm.

30

Figure 20

[図21]

プラスミド pRIT 14526 (TCA314) の作製

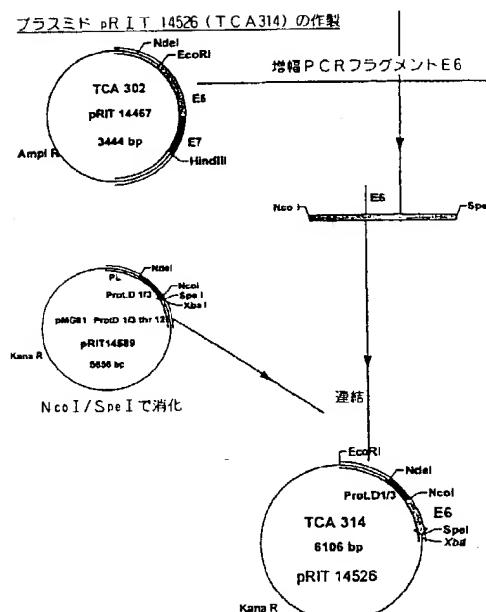


Figure 21

【図22】

P R O T . D 1 / 3 - E 6 - H i s / H P V 1 8 の配列

s ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAGCAGCCATTACATCAAATATGGCAATACCCAAATGAAATC 50
 AGACAAAATCATTAATGCTACCGTGGCTAGCGGTATTACAGAGC 100
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCGTTGACACAGGCTATTATTA 150
 10 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAAGGACTGCGTTAGTGGTTATTCAGCA 200
 TCACCTTTAGATGGCTGACTGATGTTGGAAAAAATTCGCCATCGTC 250
 ATCGTAAAGATGCCGTTACTATGTCATCGACTTACCTTAAAGAAATT 300
 CAAAGTTGAGAAATGACAGAAAATTTGAAACCAGGGCGCTTGAAGGA 350
 TCCAACACGGCACCCATCAAGGACTCTGATCTGACCGAACAA 400
 15 CTTCACTGCAAGACATAGAAAATACCTGTGATATTCAGAACAGTATTG 450
 GAACCTACAGAGGTATTGAAATTGCATTTAAAGATTATTGTTGGTGA 500
 TAGAGACAGTATACCGCATGCTGATGCCATAAAATGATAGATTTTATT 550
 CTAGAATTAGAGAAATTAGACATTTCAGACTCTGTGATGGACACAA 600
 TTGAAAACAACTAACACTGGTTACACATTAAAGGTGCT 650
 GCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACCTAGACACCTTATG 700
 AAAAACGACGATTACACACATCTGGCACTATAGAGGCCAGTCCAT 750
 TCGTGTGCAACCGGACAGCAGAACGACTCCAACCGACGAGAAC 800
 ACAAGTAACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTA 837
 ベブチド配列

25 MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 50
 EQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRKRKDGRYYVIDFTLKEI 100
 OSLEMENFETMARFEDPTTRPYKLPLDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150
 ELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAAHKCIFYSRURELRHYSVYGD 200
 LEKLNTNGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHNEKRRFHNIAGHYRGQCH 250
 30 SCCNRARQERLQRQRRRETQVTSGHHHHIBH. 279

Figure 22

【図23】

プラスミド pR I T 14618 (TCA 320) の作製

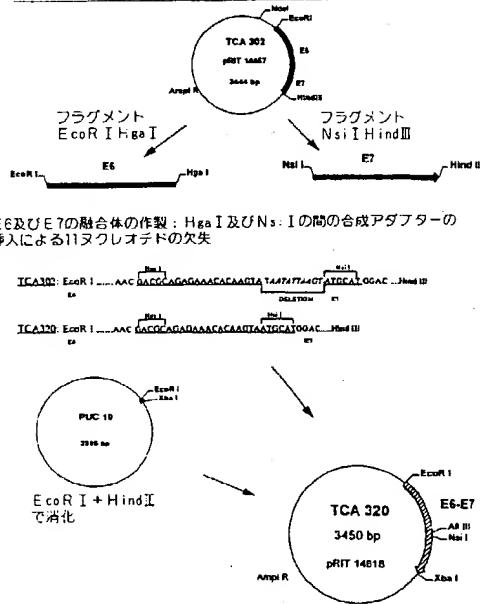


Figure 23

【図24】

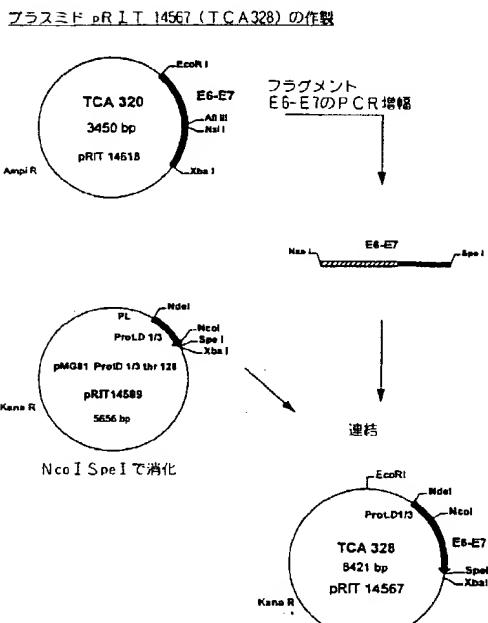


Figure 24

【図25】

P R O T . D 1 / 3 - E 6 - E 7 - H i s / H P V 1 8 の配列

ヌクレオチド配列

5 ATGGATCCAAGCAGCCATTACATCAAATATGGCAATACCCAAATGAAATC 50
 AGACAAAATCATTAATGCTACCGTGGCTAGCGGTATTACAGAGC 100
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCGTTGACACAGGCTATTATTA 150
 GAGCAAGATTAGCAATGACTAAAGGATGGCTTTAGTGGTTATTCAGCA 200
 TCACCTTTAGATGGCTGACTGATGTTGGAAAAAATTCGCCATCGTC 250
 10 ATCGTAAAGATGGCGTTACTATGTCATGACTTACCTTAAAGAAATT 300
 CAAAGTTGAGAAATGACAGAAAATTTGAAACCATGGCGCCTTGGAGGA 350
 TCCAACACGGCACCCATAAGCCTACCTGATCTGACGGAACTGAACA 400
 CTTCACGTGCAAGACATAGAAAATACCTGTGATATTGCAAGACGTTA 450
 GAACCTACAGGTTAGTGGAAATTGCAATTAAAGATTATTGTTGGTGA 500
 15 TAGAGACAGTATACCGCATGCTGATGCCATAAAATGATAGATTTTATT 550
 CTGAAATTAGAGAAATTAGACATTTACAGACTCTGTTATGGAGACACA 600
 TTGAAAAACAACTAAACACTGGTTACACATTATAAAAGGTGCT 650
 GCGGTGCCAGAAACCCCTGAATCAGCAGAAAACCTAGACACCTTATG 700
 AAAAACGACGATTACACACATCTGGGCACACTAGAGGCCAGTGGCAT 750
 20 TCGTGTGCAACCGGACGAGCACAGGACACTCCAACGACGAGAAC 800
 ACAAGTAAATGCACTGACCTAAGGAAACATTGCAAGACATTTGATT 850
 TAGAGCCCCAAATGAAATTCCGGTTGACCTTCTATGTCACGACCAATT 900
 AGCAGACTCAGAGGAAGAAAACGATGAAATGAGTGGAGTTAATCATCAACA 950
 TTTACCAAGCCCAGCCAGCCGAAACCAACGTCACACAACTGTTGTTATGT 1000
 25 GTTGTAAAGTGTGAAGCCGAAATTGAGCTAGTAGAGAAAGCTCAGCAGAC 1050
 GACCTTCGAGCATTCACGAGCTGTTCTGACACCCCTCTTGTGIG 1100
 TCCGTGTTGATGCACTCCAGCAGACTAGTGGCCACCATCACCAT 1150
 AA 1152
 ベブチド配列

30 MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 50
 EQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRKRKDGRYYVIDFTLKEI 100
 OSLEMENFETMARFEDPTTRPYKLPLDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150
 ELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAAHKCIFYSRURELRHYSVYGD 200
 LEKLNTNGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHNEKRRFHNIAGHYRGQCH 250

【図25-1】

SCCNRARQERLQRRETQVMHGPATLQDIVLHLEPQEIPV DLLCHSQL 300
 SDSEEEENDEIDGVNHQHL PARRAEFORHTMLCMCCCKCEARIELVVESSAD 350
 DLRAFQQQLFLNTLSFVCPWCAQSQTSGHHDHHHL 384

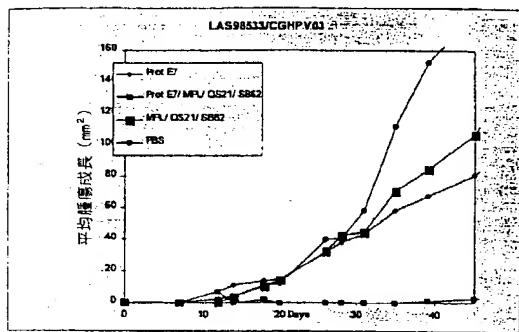
Figure 25

【図26】

Figure n° 26

HPV16のProtD1/3 E7製剤でのワクチン接種の、TC1腫瘍成長への治療効果

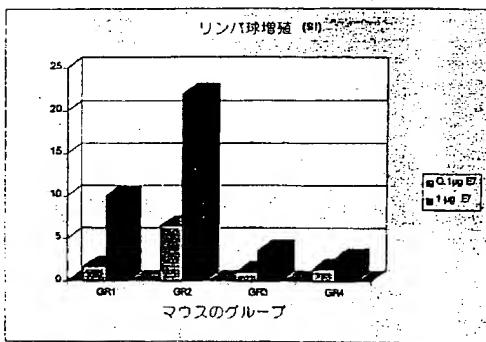
10



【図27】

- 10 Group 2: ProtD1/3 E7 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL
- Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL
- Group 4: PBS

15

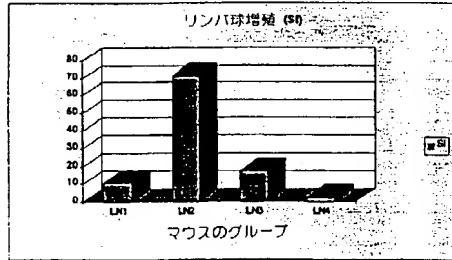


【図28】

Figure n° 28

リンパ節細胞でのリンパ球増殖
 (刺激元数)
 ProtD1/3 E7での72時間の試験管内再刺激 (1 μg/ml)
 (exp 96533)

- Group 1: ProtD1/3 E7
- Group 2: ProtD1/3 E7 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL
- Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL
- Group 4: PBS



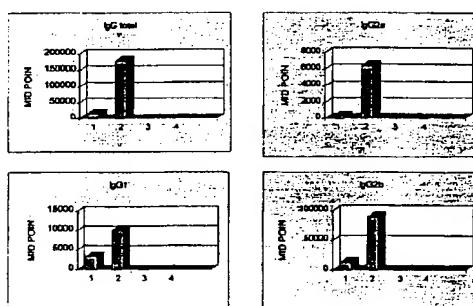
【図29】

Figure n° 29

サブクラス特異的抗体応答 (exp 96533)

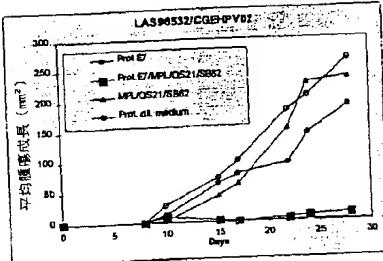
- group 1: ProtD1/3 E7 HPV16
- group 2: ProtD1/3 E7 HPV16+ SB 62 Qs21 & 3 D MPL
- group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL
- group 4: PBS

10



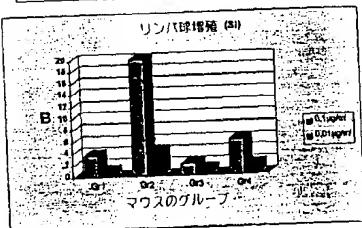
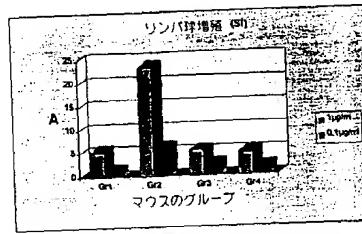
【図30】

Figure n° 30
TCI腫瘍攻撃に対するProtD1/3 E7 HPV16製剤でのワクチン接種の保護効果



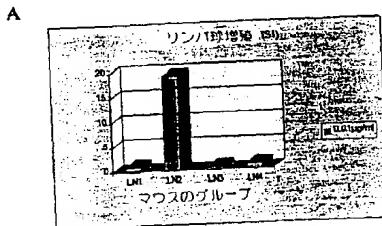
【図31】

Figure n° 31
脾細胞でのリンパ球増殖（刺激示数）(E.I.: 96532)
A) ProtD1/3 E7 (0.1 µg/ml)
B) ProtD1/3 E7 (0.1; 0.01 µg/ml)(ラテックスマイクロビーズコート)
72時間の再刺激
Group 1: ProtD1/3 E7 HPV16
Group 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL
Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL
Group 4: PBS



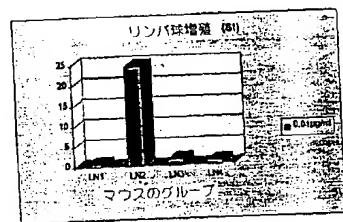
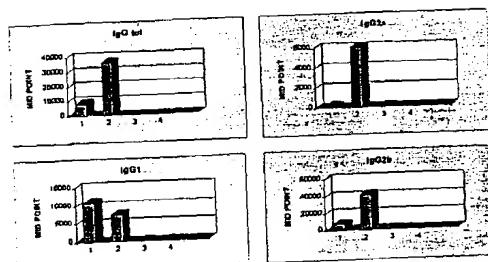
【図32】

Figure n° 32
リンパ節細胞でのリンパ球増殖
(刺激示数) (E.I.: 96532)
72時間の試験管内再刺激
A) ProtD1/3 E7 (0.01 µg/ml)
B) ProtD1/3 E7 (0.01 µg/ml)(ラテックスマイクロビーズコート)
Group 1: ProtD1/3 E7 HPV16
Group 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL
Group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL
Group 4: PBS



【図33】

Figure n° 33
ラテックス特異的抗体応答 (E.I.: 96532)
group 1: ProtD1/3 E7 HPV16
group 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL
group 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL
group 4: PBS



【図34】

Figure n° 34

脾臓細胞でのリンパ球増殖（刺激示数）

P D 1/3 18 E7 での72時間の試験管内再刺激 (10, 1, 0.1, 0.01 µg/ml)
(Exp 98038)

Group 1: ProtD 1/3 18 E7

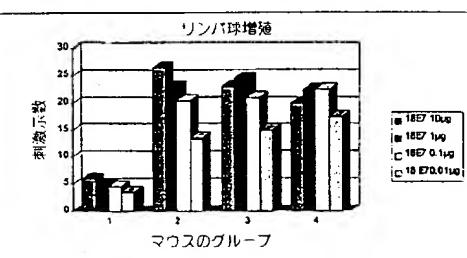
Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 + 3D-MPL

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21 + 3D-MPL + SB62 O/W

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 アルム

10

脾臓 Gr	1	2	3	4
18E7 10µg	6	27	23	20
18E7 1µg	5	23	25	23
18E7 0.1µg	5	21	21	23
18 E7 0.01µg	4	14	15	18
ベースライン/cpm	1168	1359	1025	1268



【図35】

Figure n° 35

脾高リソバ部でのリソバ球増殖

P D 1/3 18 E7 での72時間の試験管内再刺激 (10, 1, 0.1, 0.01 µg/ml)
(Exp 98038)

Group 1: ProtD 1/3 18 E7

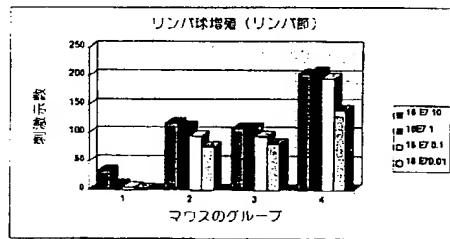
Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 + 3D-MPL

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21 + 3D-MPL + SB62 O/W

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 アルム

10

LN Group	1	2	3	4
18 E7 10	33	117	108	203
18 E7 1	8	110	108	208
18 E7 0.1	4	95	95	196
18 E7 0.01	2	75	81	141
ベースライン	325	161	131	607



【図36】

Figure n° 36

試験管内再刺激で96時間後の脾臓細胞の培養上清におけるサイトカイン生産 (ProtD 1/3 18 E7 1.3 µg/ml)

5

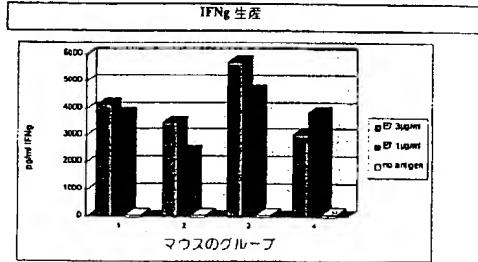
Group 1: ProtD 1/3 18 E7

Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQ 3D-MPL

Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21, 3D-MPL, SB62 O/W

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQ, 3D-MPL アルム

10



【図37】

Figure n° 37

ProtD 1/3 18 E7 での96時間の試験管内再刺激後のリソバ部細胞の培養上清におけるサイトカイン生産

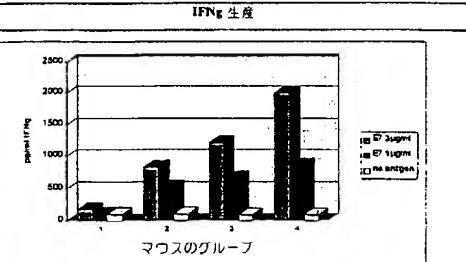
Group 1: ProtD 1/3 18 E7

Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 3D-MPL

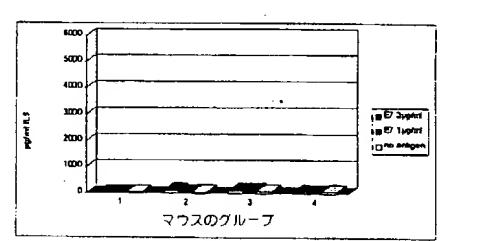
Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + SB62 QS21 3D-MPL

Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQ アルム

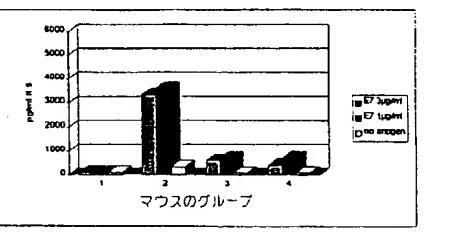
10



10



10

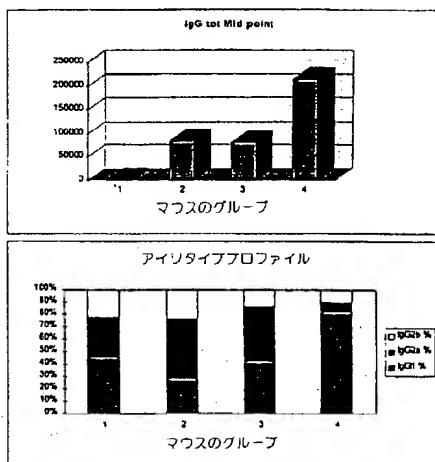


【図38】

Figure n° 38
抗体応答及びアイソタイプ (exp 98038)

Group 1: ProtD 1/3 18 E7
 5 Group 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 3DMPL
 Group 3: ProtD 1/3 18 E7 + SBD2 QS21/DMP1
 Group 4: ProtD 1/3 18 E7 + MPL DQ アルム

	anti-DII	IgG1 tot	IgG1 %	IgG2a %	IgG2b %
Groups					
1	1500	46	32	22	
2	84172	28	48	23	
3	80543	43	44	13	
4	213685	82	8	10	



【請求項11】 更なるHPV抗原を含む請求項7～10のいずれかに記載のワクチン。

【請求項12】 医薬に用いるための請求項7～11のいずれかに記載のワクチン。

【請求項13】 HPVにより誘導される良性又は悪性の腫瘍を患う被検体を免疫療法により治療するためのワクチンの製造のための請求項7～11のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項14】 HPVウイルス感染を予防するためのワクチンの製造のための請求項7～11のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項15】 請求項6に記載のDNA配列を含むベクター。

【請求項16】 請求項6に記載のDNA配列と、チオレドキシンをコードするDNA配列と、を含むベクター。

【請求項17】 請求項6に記載のDNA配列で形質転換された宿主。

【請求項18】 請求項15又は16に記載のベクターで形質転換された宿主。

【請求項19】 チオレドキシンをコードするDNA配列で更に形質転換された請求項17に記載の宿主。

【請求項20】 請求項1～4のいずれかに記載のタンパク質を生産するための方法であって、宿主細胞を請求項6に記載のDNA配列で形質転換し、該配列を発現させ、そして要求される産物を単離することを含む方法。

【請求項21】 請求項7～11のいずれかに記載のワクチンを生産するための方法であって、請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質を、適切なアジュバント、希釈剤又は他の医薬として許容される賦形剤と混合することを含む方法。

【手続補正書】 特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】 平成12年2月22日(2000.2.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘモフィルスインフルエンザBからのプロテインD又はその誘導体に連結した、E6、E7及びE6E7融合タンパク質からなる群から選択されるヒトピローマウイルス抗原を含む融合タンパク質。

【請求項2】 前記E6又はE7タンパク質がHPV16又はHPV18から得られることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 前記E7タンパク質が網膜芽腫遺伝子産物についての結合を減少させるよう変異されていることを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項4】 E6のp53領域に変異が導入されていることを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項5】 少くとも4ヒスチジン残基のヒスチジングラフを更に含む請求項1～4のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA配列。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質と、医薬として許容される希釈剤又は賦形剤と、を含むワクチン。

【請求項8】 アジュバントを更に含む請求項7に記載のワクチン。

【請求項9】 前記タンパク質が水溶性エマルションビヒクル中の油内に供されることを特徴とする請求項7又は8に記載のワクチン。

【請求項10】 前記アジュバントが、3D-MPLもしくはQS21又はそれら両方を含むことを特徴とする請求項8又は9に記載のワクチン。

【手続補正書】

【提出日】 平成12年12月21日(2000.12.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 請求項9

【補正方法】 変更

【補正内容】

【請求項9】 前記タンパク質が水中油エマルションビヒクル中に供されることを特徴とする請求項7又は8に記載のワクチン。

【手続補正2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0022

【補正方法】 変更

【補正内容】

【0022】

好ましくは、本発明のタンパク質は、トランス(T1T)でチオレドキシンと同時発現される。トランス対シスのチオレドキシンの同時発現が、プロテアーゼを必要とすることなく、チオレドキシンを含まない抗原を維持するために好ましい。チオレドキシン同時発現は、本発明のタンパク質の可溶化を容易にする。チオレドキシン同時発現は、タンパク質精製率、精製されたタンパク質の溶解度及び質に大きな影響を与える。

【手続補正3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0037

【補正方法】 変更

【補正内容】

【0037】

プラスミドTCA308 (=pRIT14501) の作製：融合タンパク質—D1/3-E7-Hisを発現するプラスミド

E 7 のアミノ酸 1 → 9 8 に相当するヌクレオチド配列を p R I T 1 4 4 6 2 から増幅する。そのポリメラーゼ鎖反応の間、N c o I 及び S p e I 制限部位を E 7 配列の 5' 及び 3' 端に作り、プラスミド p M G M C S P r o t D 1 / 3 の同じ部位への挿入を許容してプラスミド T C A 3 0 8 (= p R I T 1 4 5 0 1) を供した。その挿入物を配列決定してポリメラーゼ鎖反応の間に改変が形成されていないことを確認した。その融合タンパク質-D 1 / 3-E 7-H i s (H P V 1 6) についての配列を図 1 に記載する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 5

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 6 5】

キャラクタリゼーション：

タンパク質 D 1 / 3 E 6 H i s は次の通りキャラクタライズする。

タンパク質 D 1 / 3-E 6-H i s はプロテイン D 部分からの 1 1 2 アミノ酸を伴う 2 7 3 アミノ酸長ペプチドである。タンパク質 D 1 / 3-E 6-H i s は 3 2 kD の理論分子量を有し、S D S-P A G E で 3 3 kD タンパク質として移動する。タンパク質 D 1 / 3-E 6-H i s の理論等電点は 8. 1 7 である。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 0

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 8 0】

実施例 VIII：融合 P r o t D 1 / 3-E 7 変異 (c y s 2 4 → g l y, g l u 2 6 → g l n) 型 H P V 1 6 を発現する大腸菌株 B 1 0 0 2 の作製

1) 発現プラスミドの作製

出発材料：

0 1 1)

トランスのチオレドキシンと共に発現されるタンパク質 D 1 / 3 E 7 H i s H P V (大腸菌 B 1 0 1 2)

1) 発現プラスミドの作製

1) a. 融合タンパク質-D 1 / 3-E 7-H i s/H P V 1 8 を発現するプラスミドであるプラスミド T C A 3 1 6 (= p R I T 1 4 5 3 2) の作製

出発材料

a) プラスミド p M G M C S P r o t D 1 / 3 (= p R I T 1 4 5 8 9) はインフルエンザからの N S 1 コーディング領域のコドン 4 ~ 8 1 がヘモフィルス・インフルエンセ株 7 7 2 、バイオタイプ 2 (H Jansonら、1991、Infection and Immunity、Jan. p119~125) の成熟プロテイン D の残基 S e r 2 0 → T h r 1 2 7 に相当するコドンにより置換されている (WO 9 7 / 0 1 6 4 0 として公開された U K 特許出願 n° 9 5 1 3 2 6 1. 9 に記載される) p M G 8 1 の誘導体である。P r o t -D 1 / 3 の配列の後に多重クローニング部位 (1 1 残基) 及び C 末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域 (6 H i s) がある (図 1 5 を参照)。このプラスミドを融合タンパク質 D 1 / 3-E 7-H i s を表現させるのに用いる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 6

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 1 1 6】

T C A 3 1 6 (= p R I T 1 4 5 3 2) の作製

E 7 のアミノ酸 1 → 1 0 5 に相当するヌクレオチド配列を p R I T 1 4 4 6 7 から増幅した。そのポリメラーゼ鎖反応の間、N c o I 及び S p e I 制限部位を E 7 配列の 5' 及び 3' 端に作り、プラスミド p M G M C S P r o t D 1 / 3 の同じ部位への挿入を許容してプラスミド T C A 3 1 6 (= p R I T 1 4 5 3 2) を供した。その挿入物を配列決定して改変 E 7 / H P V 1 8 原型配列を

a) 融合 P r o t D 1 / 3-E 7-H i s をコードするプラスミド p R I T 1 4 5 0 1 (= T C A 3 0 8)

b) クローニングベクター p U C 由来のプラスミド L I T M U S 2 8 (New England Biolabs cat n° 306~28)

c) ヘモフィルス・インフルエンセ株 7 7 2 、バイオタイプ 2 (H Jansonら、1991、Infection and Immunity、Jan. p.119~125) の成熟プロテイン D の残基 S e r 2 0 → T h r 1 2 7 に対応するコドンにより、インフルエンザからの N S 1 コーディング領域のコドン 4 ~ 8 1 が置換されている p M G 8 1 (上述) の誘導体であるプラスミド p M G M C S P r o t D 1 / 3 (p R I T 1 4 5 8 9) 、P r o t -D 1 / 3 の配列の後に多重クローニング部位 (1 1 残基) 及び C 末端ヒスチジンテールのためのコーディング領域 (6 H i s) がある。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 3

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 1 1 3】

ペレット画分中にある約 4.8 kDa の主要バンドをクーマー染色したゲルにより可視化し、ウサギポリクローナル抗 c l y t a 抗体により、及びアクセスできるヒスチジンテールを検出するウシ腸アルカリホスファターゼに連結した N I - N T A コンジュゲート (Qiagen cat. n° 34510) によりウエスタン・プロットで同定した。発現のレベルは全タンパク質の約 1 % を示す。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 4

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 1 1 4】

実施例 XIII：P r o t D 1 / 3 E 7 H i s (H P V 1 8) (大腸菌 B 1

、グルタミン酸によるグリシンの置換 (E 7 中の a a 4 3 、融合タンパク質中の位置 1 5 6) を作り出す E 7 遺伝子 (ヌクレオチド 1 2 8 G → A) 中で同定した。その融合タンパク質-D 1 / 3-E 7-H i s/H P V 1 8 についての配列を図 1 6 に記載する。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 3

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 1 3 3】

E 7 遺伝子中の変異の導入をキット "Quick Change Site directed Mutagenesis (Stratagene cat n° 200518)" で実現した。p R I T 1 4 5 3 2 は H P V 1 8 の原型配列におけるグリシンのかわりに E 7 の位置 4 3 におけるグルタミン酸の存在を示したので、位置 4 3 にグリシンを導入するために変異誘発の第 2 サイクルを行った。我々は、プラスミド p R I T 1 4 8 2 9 (= T C A 3 5 3) を得た。配列決定により完全な E 7 遺伝子の変異及び組込みの存在を確認した後、その変異した E 7 の遺伝子をベクター p R I T 1 4 5 8 9 (= p M G M C S P r o t D 1 / 3) に導入してプラスミド p R I T 1 4 8 3 1 (= T C A 3 5 5) を供した (図 1 9 を参照)。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 4

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 1 3 4】

融合タンパク質-D 1 / 3-E 7 変異 (c y s 2 7 → g l y, g l u 2 9 → g l n) -H i s についての配列は図 2 0 に記載される。

2) P r o t D 1 / 3-E 7 変異 (c y s 2 7 → g l y, g l u 2 9 → g l n) -H i s/H P V 1 8 を発現する株 B 1 0 9 8 の作製

プラスミドP R I T 1 4 8 3 1を、λ p Lプロモーターの熟感受性レプレッサーを含む欠失リシンゲンを含む大腸菌A R 5 8 (Mottら、1985、Proc Natl Acad Sci. 82: 88)に導入し、カナマイシンに耐性である形質転換体についての選択により株B 1 0 9 8を供した。

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 7

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 1 7 7】

Prot D 1 / 3 1 8 E 7 単独の2回の注入で極めて弱い抗体応答が誘発される。全体の Ig G レベルはアジュバントをタンパク質ワクチンに加えることにより大きく増加した。

異なる Ig G サブクラスの濃度の分析は、アジュバント、D Q S 2 1 、 3 D - M P L 又はS B 6 2 、 Q S 2 1 / 3 D - M P L の存在下でタンパク質を注入した時、Ig G 2 a サブタイプの割合が少し増加したことを見た：非アジュバント添加タンパク質で Ig G 1 4 6 % 、 Ig G 2 a 3 2 % と比べて各々 2 8 % 、 Ig G 1 4 8 % 、 Ig G 2 a 及び 4 3 % 、 Ig G 1 4 4 % 、 Ig G 2 a 。最も強力な抗体応答は、アイソタイプ濃度の明確なシフトを伴う D Q アルムで調剤したタンパク質で得られる。(8 0 % Ig G 1 、 8 % Ig G 2 a) B a l b / c マウスにおける Ig G 2 a アイソタイプは一般に、T H 1 型の免疫応答の誘導に関連していると考えられるので、これらの結果は D Q S 2 1 、 3 D - M P L 及び S B 6 2 、 Q S 2 1 / 3 D - M P L アジュバントが体液性応答の T H 1 型プロフィールを増加させる傾向があり、 S B A S 5 は明らかな T H 2 型の応答を誘導することを示唆する。

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

P R O T . D 1 / 3 E 6 H i s / H P V 1 6 の配列

ヌクレオチド配列

```

ATGGATCCAAGCAGCCATTCTCATCAAATATGGCAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTTATGTCACCGTGGTGCTACCGGTTATTCACAGAGC 100
ATACGTTAGAACATCTGGCTTTGACAAACAGGGTGTATTATTA 150
GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTAGTGGTTATTACGA 200
TCACTTTTAGATGGCTTACTGTATGTTGCGAAAAAAATCCCACATCGTC 250
ATCGAAAGATGGCCGTTACTATGTCAGCTTACCTTAAAGAAATT 300
CAAAGTTAGAAATGACGAAAATTTGAAACCATGCCATGTTAGGA 350
CCACACAGGGCGACCAGAAAATTCACACAGCTATGACAGAGCTGCAA 400
CAAATATACATGATAATAATTAGAATGTTGACTGCAAGCAGTTA 450
CTGGGACCTGGAGTATGACTGTTGCTTCCGGGATTATGCAATGATA 500
TAGAGATGGGAAATCCATATGCTGTATGTGATAAAATGTTAAAGTTTATT 550
CTAAAATTTAGTGTATAGACATTATGTTAGTTGATGGAACACA 600
TTAGAACAGCAATACACAAACCCCTTGTGATTGTTAATTAGGTGTAT 650
TAACGTCAAAAGCCACTGTGCTCTGAAGAAAAGCAAAAGACATCTGGACA 700
AAAAGCAAAAGATCCATAATAAAGGGGTCGGGACCGGTGATGTATG 750
CTTGTGCGAGATCATCAAGAACACCGTAGAGAAAACCCAGCTGATGCATGG 800
CCACCATCACCATCACCATTA 822
ペプチド配列
MDPSSHSNNMANQMSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 50
EQDLAMTKDGRVVHDFLDGLTDVAKKFPHRHKRDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLEMTEFNFMFQDPQERPRKLQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL 150
LRREVYDFAFRDLCLIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTT 200
LEQQYNKPLCDLLIRCINCKQPLCPPEEKQRHLKDQRFHNIRGRWTGRCM 250
SCCRSSRTRRETQLTSGHHHHHH. 273

```

Figure 3

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正内容】

【図1】

タンパク質D 1 / 3 E 7 His

```

1 MDPSSHSNNMANQMSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL
51 EQDLAMTKDGRVVHDFLDGLTDVAKKFPHRHKRDGRYYVIDFTLKEI
101 QSLEMTEFNFMFQDPQERPRKLQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL 150
151 IDGPAQQAEPDRAHYNIVTFCCCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGT
201 GIVCPICSQXPTSGHHEHHHH. 220

```

Figure 1

融合タンパク質Prot D 1 / 3 E 7 - Hisテールを発現するプラスミドの配列 (HPV 16からのE)

```

1 ATGGATCCAAGCAGCCATTCTCATCAAATATGGCAATACCCAAATGAAATC 50
51 AGACAAAATCATTTATGTCACCGTGGTGCTACCGGTTATTCACAGAGC 100
101 QSLEMTEFNFMFQDPQERPRKLQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL 150
151 IDGPAQQAEPDRAHYNIVTFCCCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGT
201 GIVCPICSQXPTSGHHEHHHH. 220

```

Figure 1

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】

P R O T . D 1 / 3 - E 6 - E 7 - H i s / H P V 1 6 の配列

```

ペプチド配列
ATGGATCCAAGCAGCCATTCTCATCAAATATGGCAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTTATGTCACCGTGGTGCTACCGGTTATTCACAGAGC 100
101 QSLEMTEFNFMFQDPQERPRKLQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL 150
151 IDGPAQQAEPDRAHYNIVTFCCCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGT
201 GIVCPICSQXPTSGHHEHHHH. 220

```

ペプチド配列

```

MDPSSHSNNMANQMSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 50
EQDLAMTKDGRVVHDFLDGLTDVAKKFPHRHKRDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLEMTEFNFMFQDPQERPRKLQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL 150
151 IDGPAQQAEPDRAHYNIVTFCCCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGT
201 GIVCPICSQXPTSGHHEHHHH. 220

```

Figure 6

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図8】

PROT.D1/3-E7 変異 (cys24→glu, glu26→glu) HP V16の配列

ヌクレオチド配列:

ATGGATCCAAGCAGGCAATTCTACAAATATGCCAATACCCAAATGAAATC 50
 AGACAAAATCATTTATGCTCACCGTGGTGTAGCGGTATTTACAGAGC 100
 ATACGTAGAACATCAAAGCACTTGCCTTGACACAACAGGCTGATTATTA 150
 GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGAATGGCTTGTAGTGGTATTCACGCA 200
 TCACTTTTATGCGCTGACTGTGTTGCCAAAAATCCCACATGCTC 250
 ATCGTAAAGAGGGCGCTTACTATGTCATGCACTTACCTTAAAGAAATT 300
 CAAAGTTAGAAATGACAGAAAAACCTTGAACCATGGCCATGGCATGGAGA 350
 TACACCTACATTGATGAATATTTAGATTTGCAACCAAGAGACAACTC 400
 ATCTCTACCGTTATCAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAA 450
 ATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGACAACCGGACAGAGCCATTACAATAT 500
 TGTAACCTTTTGTGCAATGTGACTCTACGTTGGTGTGCGTACAAA 550
 OCACACAGCTAGACATTCGACTTTGGAAACCTGTTAATGGCACACTA 600
 GGAATTGTCGCCCCATCTGTCTCAGAAACCAACTAGTGGCCACCATCA 650
 CCATCACCATAA 663

変異: T409 → G

G415 → C

ペプチド配列:

MDPSSHSSNMANTQMSKDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 50
 EQLAMTKDQRLLVHNDHFLDGLTDVAKKPFHRHDKDGRYYVIDFTLKEI 100
 QSLLEMNTENFETMAMHGDPTTLHEYMLDLQPEITDLYGVQQLNDSSEEDE 150
 IDGPAGQAEPDRHYNIYTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLLEDLMGTL 200
 GIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 220

変異したアミノ酸: cys24→glu (= C 24→G), glu26→glu (= E 25→G) of E7は融合タンパク質の残基137及び139である

Item M D P-ProD1/3(aa4 → 11)-M A-mutated E7(aa 114 → 211)-

TSGHHHHHHH Cter.

Figure 8

【手続補正17】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図12

【補正方法】変更

【補正内容】

【図12】

CLYTA-E7-His.の配列

ヌクレオチド配列

ATGAAAGGGGAATTGTACATTGAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
 TGAGAAAAATCATGCACTTGTGACTTGTGAGCTTACGGTGTAGCGTATATC 100
 TTGAGACCCGCTGGGAAACGACAGACGGCAACTGGTACTGGTGTAGCGAC 150
 AACCTCAGGGAAATGGGCTACAGGCTGGAAAGAAAAATCCCTGATAACTGGT 200
 CTATTCTAACGAAAGGTGCGATGAGACAGGCTGGGCTCAAGTACAAGG 250
 ACACCTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGGCCATGOTATCAAAATGCC 300
 TTATCCAGTCAGGGACGGAACAGCGCTGGTACTACCTCAAAACAGACGG 350
 AACACTGGCAGACAGCCAGAAATTGGGCAAGCTGGGACATGGCCATAGC 400
 ATGGAGATACACCTACATTGCAATATGTTAGATTTGCAACCGAG 450
 ACAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGG 500
 GGATGAAATAGATGGTCAGCTGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCATT 550
 ACAATATTGTAACCTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTGGTGTG 600
 GTACAAAGCACACACGAGACATTGCTACTTTGGAAACCTGTTAATGGG 650
 CACACTAGGAATTGTCGCCCCATCTGTTCTAGAAACCAACTAGTGGCC 700
 ACCATCACCACTACCACTAA 720

ペプチド配列

MKGIVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGWYWF 50
 NSGEMATGWKKIADKWWYFNEEGAMKTGWWVVKYKDWTWYLDKEGAMVSNA 100
 F1QSDAGTGWYVYLKPDPGTLADRPELASMLDMAMHGDPTTLHEYMLDLQPE 150
 TTDLYCYEQLNDSSEEDIDGPAGQAEPDKAHYNIVTFCCCKCDSTLRLC 200
 VQSTHVDIRTLLEDLMGTLGIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 220

Figure 12

【手続補正16】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図10

【補正方法】変更

【補正内容】

【図10】

CLYTA-E6-Hisの配列

ヌクレオチド配列

ATGAAAGGGGAATTGTACATTGAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
 TGAGAAAAATCATGCACTTGTGACTTGTGAGCTTACGGTGTAGCGTATATC 100
 TTGAGACCCGCTGGGAAACGACAGACGGCAACTGGTACTGGTGTAGCGAC 150
 AACCTCAGGGAAATGGGCTACAGGCTGGAAAGAAAAATCCCTGATAACTGGT 200
 CTATTCTAACGAAAGGTGCGATGAGACAGGCTGGGCTCAAGTACAAGG 250
 ACACCTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGGCCATGOTATCAAAATGCC 300
 TTATCCAGTCAGGGACGGAACAGCGCTGGTACTACCTCAAAACAGACGG 350
 AACACTGGCAGACAGCCAGAAATTGGGCAAGCTGGGACATGGCCATAGC 400
 ATGGAGATACACCTACATTGCAATATGTTAGATTTGCAACCGAG 450
 ACAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGG 500
 GGATGAAATAGATGGTCAGCTGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCATT 550
 ACAATATTGTAACCTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTGGTGTG 600
 GTACAAAGCACACACGAGACATTGCTACTTTGGAAACCTGTTAATGGG 650
 CACACTAGGAATTGTCGCCCCATCTGTTCTAGAAACCAACTAGTGGCC 700
 ACCATCACCACTACCACTAA 720

ペプチド配列

MKGIVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGWYWF 50
 NSGEMATGWKKIADKWWYFNEEGAMKTGWWVVKYKDWTWYLDKEGAMVSNA 100
 F1QSDAGTGWYVYLKPDPGTLADRPELASMLDMAMHGDPTTLHEYMLDLQPE 150
 TTDLYCYEQLNDSSEEDIDGPAGQAEPDKAHYNIVTFCCCKCDSTLRLC 200
 VQSTHVDIRTLLEDLMGTLGIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 220

Figure 10

【補正内容】

【図13】

プラスミド pRIT14629 (図A331) の作型

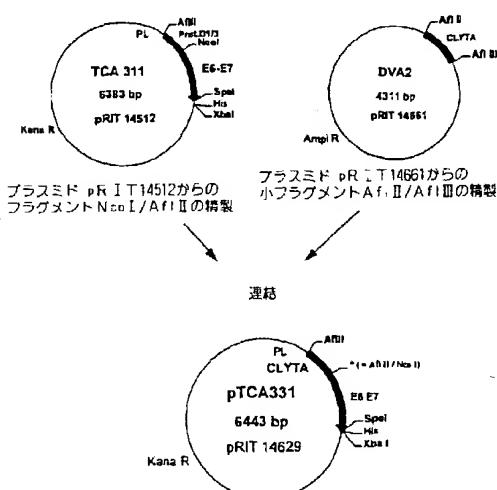


Figure 13

【手続補正18】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図13

【補正方法】変更

【手続補正19】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図14

【補正方法】変更

【補正内容】

【図14】

CL YTA-E6E7-Hisの配列
ヌクレオチド配列
ATGAAAGGGGAATTGTACATTCAAGACGGCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
TGAGAAAATCAATGCACTTGTACTACTTGTGAGCTAGGCTATAAGC 100
TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGTTACTGGTCAGC 150
AAGCTCAGCGAAATGGTACAGCTGAGAAAATCCTGAGTACAAGG 200
CTATTCACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGTCAGTACAAGG 250
TTTATCCAGTCAUCGAGCGAACAGCTGGTACTACCTCAAAACAGACGG 300
AACACTGGCAGACAGCGGAGAATGGCCAGEATGCTGACATGGCATGT 350
TTCAAGGACCCAGGAGGGCAGGAAAGTACACAGTTATGCAAGAG 400
CTGCAAACAACTATACATGAGTATAATAGATGATGTTACTGCAAGCA 500
ACAGTTACTGGCAGGAGGTTATGACTTGTGTTAGGTTATGCAAGCA 550
TAGTATATAGAGATGGGAATCATATGCTGTTAGTGTATAAATGTTAAAG 600
TTTATCTAAAGTATGAGTATGACATATGTTATGTTGTTATG 650
AACACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTTGATTGTTAATT 700
GOTGTTAACTCTAAAGGACTGTTGCTCTGAGAAAAGCAAAGGACAT 750
CTGGACAAAAGGAAAGTCCATAATAAGGGTGTGACGGTGTGACGGCTG 800
ATGATATGCTTGTGCAAGTCAAAAGAACAGTGTAGAACGGCTG 850
TGCATGGAGATACCTACATGCTGATATATGTTGATGTTGCAACCA 900
GAGACAACTGATCTCTACTTGTATGACCAATTAAATGACGTCAGGGA 950
GGAGGATGAAATAGATGGTCCAACTGAGCAAGGAGAACGGACAGGCC 1000
ATTACAAATGTTAACCTTTGTTGCAAGTGTACTCTACGGCTGTTG 1050
TCCGTACAAAGCACACAGTGTAGCATTCGTTGAGAACGGCTGTTAAT 1100
GGGACACTAGGAATTGTTGTCCTGAGTAAACCAACTAGT 1150
GCCACCATCACCATCACCATAA 1173
ペプチド配列
MKGGIVHSDGSYVKDKFEKJNGTWYYFDOSGYMLADRWRKHTDGNWYWD 50
NSGEGMATGWKKIADKWWYFNEEGAMKTGWWVYKDTWYLYDAKECAMVSNA 100
FIOSADGTWVYVLPKPGTLADRPELASMLOMAMFQDPOERPKLQLCTE 150
LQTTHDIILECVYCKQQLRKREVVYDFARFLCIVYRDGPNYAVCDKCLK 200
FYKSISEVRHYCYSLYGTLEQQYNKPLCDLIRNCNQKPLCPEEKQRH 250
LDKKQRPHMIRGRWTGRCMSCCRSSRTRETQLMHCDTPHLYEYMDLQJ 300
ETTDLYCYBQLNDSSSEEDIEIDPAGQAEPDRAFTYNIYTFCXKCDSTRL 350
CVQSTHVDIATLEDLLMGTGIVYTCISQKPTSGRHHHHHH. 390

Figure 14

【手続補正20】

【補正対象書類名】図面

【補正内容】

【図18】

チオレドキシンの配列

MSDKIHLTDDSFDTDVLKADGAIIVDFWAEWCOPCKMIA 40
PILDEIADEYQGKLTVAKLNLIDQNPGTAPKYGIRGIPILL 80
LFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA.109

Figure 18

【手続補正22】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図20

【補正方法】変更

【補正内容】

【補正対象項目名】図16

【補正方法】変更

【補正内容】

【図16】

PROT.D1/3-E7-HIS/HPV18の配列

ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAGCAGGCCATTCAAAATGGGAATACCAAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATGCTCACCGCTGGCTAGCGGTTATTACAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAACACTTGCCTTGGCACAACAGGCTGATTATTA 150
GAGCAAGATGCAACTGACTAAGGATGGCTTGTGGTTATTACAGA 200
TCACTTTAGATGGCTTGTACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGC 250
ATCGTAAAGATGGCTTGTACTATGTCATCGACTTACCTAAAAGAAATT 300
CAAAGTTAGAAATGACAGAAAATGAAACCATGGCATGGACC 350
TAAGGCAACATGCAAGACATTGTTGCAATTAGGCCCCAAATGAAA 400
TTCCGTTGACCTTCTAGGTACCGAGCAATTAAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450
AACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCACATTTACCAACGGCCAGC 500
CGAACACACCGTCACAACTGTTGTTGTAAGTGTGAAAGGCC 550
GAATTGAGCTAGTACTAGAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCACTCCAG 600
CAGCTTCTGCAACACCTGTCCTTGTGTCCTGAGTGTGCACTCCA 650
GCAGACTAGTGGCCACCATCACCACATCACCATTAA 684

ペプチド配列

MDPSHSSNMANTQMSDKIIAHRGASGYLPENTLESKA 40
LAFAQDYLEQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKF 80
PHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMENFETMAMHGPKAT 120
LQDIVLHLEPQEIPVDSLICHEQLSDSEEENDEIDEVNHQ 160
HLPARRAEPQRHMLCMCCKCEARIELVVESSADDLRAFQ 200
QLFLNTLSFVCPWCASQTSGHHHHHHH.227

Figure 16

【手続補正21】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図18

【補正方法】変更

【図20】

PROT.D1/3-E7変異(cys27→gly,glu29→glu)HPV18の配列

ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAGCAGGCCATTCAAAATGGGAATACCAAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATGCTCACCGCTGGCTAGCGGTTATTACAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAACACTTGCCTTGGCACAACAGGCTGATTATTA 150
GAGCAAGATGCAACTGACTAAGGATGGCTTGTGGTTATTACAGA 200
TCACTTTAGATGGCTTGTACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGC 250
ATCGTAAAGATGGCTTGTACTATGTCATCGACTTACCTAAAAGAAATT 300
CAAAGTTAGAAATGACAGAAAATGAAACCATGGCATGGACC 350
TAAGGCAACATGCAAGACATTGTTGCAATTAGGCCCCAAATGAAA 400
TTCCGTTGACCTTCTAGGTACCGAGCAATTAAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450
AACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCACATTTACCAACGGCCAGC 500
CGAACACACCGTCACAACTGTTGTTGTAAGTGTGAAAGGCC 550
GAATTGAGCTAGTACTAGAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCACTCCAG 600
CAGCTTCTGCAACACCTGTCCTTGTGTCCTGAGTGTGCACTCCA 650
GCAGACTAGTGGCCACCATCACCACATCACCATTAA 684

変異：T418→G

G424→C

ペプチド配列

MDPSHSSNMANTQMSDKIIAHRGASGYLPENTLESKA 40
EQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLEMENFETMAMHGPKATLQDIVLHLEPQEIPVDSLICHEQLSDSEE 150
NDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHMLCMCCKCEARIELVVESSADDLRAFQ 200
QLFLNTLSFVCPWCASQTSGHHHHHHH.227

変異したアミノ酸:cys27→gly(=C27→G), glu29→glu(=E29→Q) of E7
は結合タンパク質の残基140及び142である。N term MDP-ProtD1/3(aa4→111)-M A-mutated E7(aa 114→218)-TSGHHHHHHH
C term.

Figure 20

【手続補正23】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図22

【補正方法】変更

【補正内容】

【図22】

PROT.D1/3-E6-His/H PV18の配列

ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAGCAGCCATTCAAAATGGCGAATACCAAATGAAATC 50
 AGACAAAATCATTATGCTCACCGTTGGCTACGGTTTATTACAGAGC 100
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCGTTGCACAAACAGGCTGATTATTA 150
 GAGCAAGATTAGCAACTAAGGATGGCTTGTGGTTACCGA 200
 TCACTTTTAGATGGCTTGTACTGATGTTGCGAAAAAAATTCACATCGTC 250
 ATCGTAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAGAAATT 300
 CAAAAGTTAGAAATGACAGAAAACCTTGAACCATGGCGCTTGGAGA 350
 TCCAACACGGCGACCTACAAGCTACCTGATCTGTGCAACGGAAC 400
 CTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTATATITGCAAGACAGTATG 450
 GAACCTACAGAGGTATTTGAAATTGCAATTAAAGATTATTTGTTGTA 500
 TAGAGACAGTATACCGCATGCTGCATGCCATAATGTATAGATTTTATT 550
 CTAGAATTAGAGAATTAAAGACATTATCAGACTCTGTATGGAGACACA 600
 TTGAAAAAACTAACTAACACTGGTTTACAATTITATATAAAGGTGCT 650
 GCGGTGCGAGAAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAAACATAGACACCTTAATG 700
 AAAAACGACGATTTCACACATAGCTGGCACTATAGAGGCCAGTGCCAT 750
 TCGTGTGCAACCGACAGCACAGGAACGACTCCAAACGACGCCAGAGAAC 800
 ACAAGTAACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTA 837

ペプチド配列

MDPSSHSSNMANQMKSDKIIIAHRGASGYLPENHLESKALAFQQADYL 50
 EQDLAMTKDGRVVIIDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYVVVIDFTLKEI 100
 QSLEMTENFETMARFEDPTTRPYKLIPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150
 ELTEVFEFAFKDLFVYVYRDSIPHAACHKCIDFTSIRELRHYSOSVYGD 200
 LEKLNTGGLYNNLIRCLRCQPKLNPAAEKLRLHNEKRRFHNIACHYRGQCH 250
 SCNRARQERLQRRETQVTSGHHHHHH. 278

Figure 22

【手続補正24】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図25

【補正方法】変更

【補正内容】

【図25】

PROT.D1/3-E6-E7-His/H PV18の配列

ヌクレオチド配列

ATGGATCCAAGCAGCCATTCAAAATGGCGAATACCAAATGAAATC 50
 AGACAAAATCATTATGCTCACCGTTGGCTACGGTTTATTACAGAGC 100
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCGTTGCACAAACAGGCTGATTATTA 150
 GAGCAAGATTAGCAACTAAGGATGGCTTGTGGTTACCGGTT 200
 TCACTTTAGATGGCTTGTACTGATGTTGCGAAAAAAATTCACATCGTC 250
 ATCGTAAGATGGCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAGAAATT 300
 CAAAAGTTAGAAATGACAGAAAACCTTGAACCATGGCGCTTGGAGA 350
 TCCAACACGGCGACCTACAAGCTACCTGATCTGTGCAACGGAAC 400
 CTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTATATITGCAAGACAGTATG 450
 GAACCTACAGAGGTATTTGAAATTGCAATTAAAGATTATTTGTTGTA 500
 TAGAGACAGTATACCGCATGCTGCACTCCACATAAATGTTATGATTTTATT 550
 CTAGAATTAGAGAATTAAAGACATTATCAGACTCTGTATGGAGACACA 600
 TTGAAAAAACTAACTAACACTGGTTTACCAATTATIAAAGGTGCT 650
 GCGGTGCGAGAAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAAACATAGACACCTTAATG 700
 AAAAACGACGATTTCACACATAGCTGGCACTATAGAGGCCAGTGCCAT 750
 TCGTGTGCAACCGACAGCACAGAACGACTCCAAACGACGCCAGAGAAC 800
 ACAAGTAATOCATGACCTAAAGCAACATGCAAGACATTGATTGATTGATT 850
 TAGAGCCCCAAAATGAAATCCCGTGTGACCTTCTATGTCACAGCAATTAA 900
 AGCGACTCAAGAGGAAAACCGATGAAATAGATGAGTTAAATCATCAACA 950
 TTGACCGCCCCAGAGCGAACACACACGTCACACAATCTGTGTATGT 1000
 GTTGTGAGTGTGAGGCCAGAATGAGCTAGTAGAGAAAGCTGACAGAC 1050
 GACCTTGGAGCATTCACGACAGCTGTTCTGAAACACCCCTGTCCTTGIGTG 1100
 TCCGTGGTGTGCACTCCAGCAGACTAGTGCCACCATCACCATCACCAT 1150
 AA 1152

ペプチド配列

MDPSSHSSNMANQMKSDKIIIAHRGASGYLPENHLESKALAFQQADYL 50
 EQDLAMTKDGRVVIIDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYVVVIDFTLKEI 100
 QSLEMTENFETMARFEDPTTRPYKLIPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150
 ELTEVFEFAFKDLFVYVYRDSIPHAACHKCIDFTSIRELRHYSOSVYGD 200
 LEKLNTGGLYNNLIRCLRCQPKLNPAAEKLRLHNEKRRFHNIACHYRGQCH 250
 SCNRARQERLQRRETQVTSGHHHHHH. 278

Figure 25

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク(参考)
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 37/00	4 H 0 4 5
37/00		C 0 7 K 14/025	
C 0 7 K 14/025		19/00	
19/00		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 P 21/02		5/00	A

(81)指定国 E P (A T, B E, C H, C Y,
 D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I
 T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J
 , C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L,
 M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K
 E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A (A M
 , A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M)
 , A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G,
 B R, B Y, C A, C H, C N, C U, C Z, D E, D
 K, E E, E S, F I, G B, G E, G H, G M, H R
 , H U, I D, I L, I S, J P, K E, K G, K P,
 K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L
 V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z
 , P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I,
 S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U G, U
 S, U Z, V N, Y U, Z W

(72)発明者 カベゾン シルバ, テレサ
 ベルギー国, ベー1330 リクサンサー, リュ ドウ ランスティテュ 89, スミス
 クライン ビーチャム バイオロジカルズ
 ソシエテ アノニム
 (72)発明者 デリッス, アンヌーマリー, エバ フエル
 ナンド
 ベルギー国, ベー1330 リクサンサー, リュ ドウ ランスティテュ 89, スミス
 クライン ビーチャム バイオロジカルズ
 ソシエテ アノニム

(72)発明者 ジェラール, カトリーヌ マリー ギスレ
 ーヌ
 ベルギー国, ベー1330 リクサンサー, リュ ドウ ランスティテュ 89, スミス
 クライン ビーチャム バイオロジカルズ
 ソシエテ アノニム

(72)発明者 ロンバールドーベンチェック, アンジェラ
ベルギー国, ベー1330 リクサンサー, リュ ドウ ランスティテュ 89, スミス
クライン ビーチャム バイオロジカルズ
ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA32 BA80
CA07 DA06 EA04 FA02 GA11
GA19 GA25 HA03
4B064 AG01 AG32 CA02 CA19 CC01
CC06 CC24 CE02 CE03 CE04
CE06 CE08 CE10 CE11 CE12
DA01 DA05 DA13 DA14
4B065 AA01Y AA26X AA41Y AA49Y
AA95Y AB01 AC14 AC20
BA02 BC03 BC50 BD01 BD14
BD15 BD16 BD17 BD18 CA24
CA45
4C076 AA17 CC18 CC27 DD08 DD30
DD34 DD59 DD63 DD70 FF04
FF13
4C085 AA38 BA55 CC07 DD62 EE06
FF12 FF14 FF18 FF19
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41
CA01 CA11 DA86 EA28 EA31
FA74 GA01 GA10 GA15 GA20
GA23 GA26 GA31

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.
PCT/EP 98/05285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/62 C07K14/025 C07K16/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 0 456 197 A (BEHRINGERWERKE AG) 13 November 1991</p> <p>see abstract see page 2, line 1-23 see page 2, line 25 - page 3, line 4 see claims</p> <p>—</p> <p>WO 96 26277 A (CANTAB PHARMA RES ;WHITTLE NIGEL RICHARD (GB); CARMICHAEL JEREMY P) 29 August 1996</p> <p>see abstract see page 4, line 5 - page 15, line 34 see examples</p> <p>—</p> <p>—</p>	<p>1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23</p> <p>1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23</p>
X		—/—

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority (claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 April 1999

Date of mailing of the international search report

16/04/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.
PCT/EP 98/05285

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 05248 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 2 April 1992 see abstract see page 7, line 5 - page 9, line 21 see examples ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
X	DE 44 41 197 C (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 28 March 1996 see the whole document ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
X	WO 93 22338 A (UNIV LEIDEN) 11 November 1993 see the whole document ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
X	FR 2 586 428 A (PASTEUR INSTITUT) 27 February 1987 see abstract ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
A	EP 0 386 734 A (BEHRINGWERKE AG) 12 September 1990 see the whole document ---	1,3-5, 8-11, 13-17, 19,20, 22,23
A	WO 96 36702 A (SCHERING CORP) 21 November 1996 -----	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05285

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

 The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Remark: although claim 7 shares no hierarchical dependence from any of the claims of the invention and although its formulations, relating to a heterologous protein fused to a c-LYTA tag and a histidine tag, is far beyond the scope of the present invention, a search has been carried out limitedly to the disclosures of the claims and examples, whereas the heterologous protein is an E6 or E7 from HPV-16 or HPV-18 (see Art.6 PCT and PCT Search Guidelines III.3.7).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members				International Application No PCT/EP 98/05285
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 0456197 A	13-11-1991	DE 4015044 A AU 650648 B AU 7621291 A CA 2042236 A JP 4227000 A PT 97621 A,B US 5753233 A	14-11-1991 30-06-1994 14-11-1991 11-11-1991 17-08-1992 31-03-1992 19-05-1998	
WO 9626277 A	29-08-1996	AU 4727296 A CA 2211995 A EP 0812358 A JP 11501804 T	11-09-1996 29-08-1996 17-12-1997 16-02-1999	
WO 9205248 A	02-04-1992	AU 8762991 A CN 1067382 A	15-04-1992 30-12-1992	
DE 4441197 C	28-03-1996	WO 9616181 A EP 0792368 A JP 10508754 T	30-05-1996 03-09-1997 02-09-1998	
WO 9322338 A	11-11-1993	AU 675794 B AU 4358693 A AU 7197096 A CA 2112798 A EP 0593754 A JP 7503975 T NZ 253330 A ZA 9303135 A	20-02-1997 29-11-1993 06-02-1997 11-11-1993 27-04-1994 27-04-1995 25-06-1996 02-02-1994	
FR 2586428 A	27-02-1987	AT 70280 T CA 1279276 A DE 3682893 A DK 208987 A EP 0235187 A WO 8701375 A GR 862201 A JP 2818745 B JP 8308597 A JP 11023577 A JP 10114677 A JP 2755574 B JP 63500662 T PT 83255 B	15-12-1991 22-01-1991 23-01-1992 26-06-1987 09-09-1987 12-03-1987 23-12-1986 30-10-1998 26-11-1996 29-01-1999 06-05-1998 20-05-1998 10-03-1988 31-07-1989	
EP 0386734 A	12-09-1990	DE 3907721 A AT 128144 T AU 624485 B AU 5110490 A CA 2011878 A DE 59009669 D DK 386734 T ES 2078255 T IE 67798 B JP 2289600 A PT 93393 A,B US 5547846 A	20-09-1990 15-10-1995 11-06-1992 13-09-1990 10-09-1990 26-10-1995 05-02-1996 16-12-1995 01-05-1996 29-11-1990 07-11-1990 20-08-1996	
WO 9636702 A	21-11-1996	US 5843752 A	01-12-1998	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 98/05285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9636702 A		AU 5729196 A	29-11-1996
		CA 2220575 A	21-11-1996
		EP 0826038 A	04-03-1998
		JP 10507933 T	04-08-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

page 2 of 2